

1AP20 Rec'd PCT/PTO 18 APR 2006

DISPOSITIF DE TRAVAIL COMPRENANT UNE ZONE LOCALISEE DE
CAPTURE D'UNE GOUTTE D'UN LIQUIDE D'INTERET

Domaine technique

5 La présente invention se rapporte à un dispositif de travail, à une plaquette, à un système et à une puce comprenant des zones localisées de capture d'une goutte d'un liquide d'intérêt.

10 La présente invention permet d'obtenir une matrice de gouttes localisées, à haute densité, sur une surface, à partir d'un liquide d'intérêt. Elle permet par exemple d'assurer facilement la transition d'une chambre fluidique fermée et remplie par un liquide d'intérêt à une matrice de gouttes, ou micro-volumes,
15 parfaitement localisées sur une surface placée dans ladite chambre fluidique, lorsque le liquide d'intérêt est évacué de ladite chambre fluidique.

Par matrice de gouttes, on entend un arrangement déterminé desdites gouttes, sans qu'une
20 forme géométrique particulière dudit arrangement soit exigée. La matrice de gouttes peut être ronde, carrée, polygonale et même aléatoire, l'essentiel étant que les gouttes formées soient disposées de manière localisée et déterminée sur la surface conformément à l'objectif
25 atteint par la présente invention. Par localisée, on entend circonscrite, individualisée et distincte des autres gouttes capturées volontairement sur ladite surface grâce au dispositif de l'invention.

30 Chacune des gouttes peut être soumise à une ou plusieurs opérations destinées à analyser qualitativement et/ou quantitativement un ou plusieurs

analyte(s) présent(s) ou susceptible(s) d'être présent(s) dans le liquide d'intérêt, par exemple une molécule, un oligonucléotide, une protéine, etc. L'analyse des analytes dans la goutte peut être
5 réalisée par toute technique connue de l'homme du métier pour effectuer des analyses, en particulier dans un volume de liquide aussi réduit qu'une goutte. Il peut s'agir des techniques d'analyse utilisées sur les puces biologiques. L'analyse peut ou non faire
10 intervenir la surface du dispositif de l'invention recouverte par la goutte, suivant la mise en œuvre de la présente invention.

Chacune des gouttes forme un volume dans lequel des réactions chimiques ou biochimiques peuvent être
15 réalisées. Toute réaction chimique ou biochimique connue de l'homme du métier peut être réalisée dans ce volume. Ces réactions peuvent ou non faire intervenir la surface du dispositif de l'invention recouverte par la goutte, suivant la mise en œuvre de la présente
20 invention. Lorsque ces réactions font intervenir la surface du dispositif de l'invention recouverte par la goutte, elles peuvent le faire avec une seule goutte ou plusieurs gouttes déposées successivement sur cette surface, ces gouttes successives étant constituées d'un
25 seul ou de plusieurs liquides d'intérêt différents suivant la mise en œuvre de la présente invention. Un exemple de réactions chimiques faisant intervenir deux liquides d'intérêt différents sur un dispositif de l'invention est le suivant : au moyen d'une goutte d'un
30 premier liquide d'intérêt, dépôt localisé d'un film d'un polymère organique sur la surface couverte par

cette goutte, puis, au moyen d'une goutte d'un deuxième liquide d'intérêt, fonctionnalisation du film polymère organique déposé sur cette surface.

Selon la présente invention, analyse(s) et
5 réaction(s) chimique(s)/biochimique(s) peuvent être
mises en œuvre de manière exclusive sur un dispositif
conforme à la présente invention (analyse ou réaction),
ou de manière complémentaire. Dans ce dernier cas, cela
peut être simultanément (réaction et analyse) ou
10 successivement (réaction puis analyse ou analyse puis
réaction). En outre, plusieurs analyses et/ou plusieurs
réactions peuvent se succéder. Par exemple, le
dispositif de la présente invention peut
avantageusement intervenir, d'une part dans la
15 fabrication d'une carte, ou laboratoire sur puce (par
exemple par des réactions chimiques permettant de
déposer un polymère, puis de le fonctionnaliser)
(« lab-on-chip »), dans laquelle toutes les étapes
nécessaires aux analyses qualitatives et quantitatives
20 d'un liquide d'intérêt sont intégrées : manipulation de
fluide, réactions chimiques et/ou biochimiques, puce de
détection optique, électrique et/ou chimique, etc. ; et
d'autre part dans l'utilisation de cette carte, ou
laboratoire sur puce, pour effectuer des analyses
25 qualitatives et/ou quantitatives dans des gouttes d'un
liquide d'intérêt à analyser (réaction(s)
chimique(s)/biochimique(s) et analyse).

Compte tenu de ces très nombreuses
applications, le dispositif de la présente invention
30 est appelé dans la présente « dispositif de travail ».

Dans la présente description, les références entre crochets [] renvoient à la liste de références annexée.

5 Art antérieur

Aucune antériorité n'a été relevée sur le principe de la présente invention. Toutefois, selon les applications envisagées, cette invention se rapproche de plusieurs domaines précis : formation de gouttes, travail en micro-volume(s), matrices à haute densité de gouttes ou plots.

La formation de zones localisées pour isoler une phase liquide est répandue dans le domaine des puces biologiques, et notamment des puces à ADN. Pour ces applications, le volume réactionnel est souvent très réduit pour économiser les produits biologiques et les réactifs.

Pour la formation de gouttes localisées et de matrices à haute densité de gouttes, les sociétés Protogene Laboratories Inc. [1] et Affymetrix Inc. [2] ont séparément développé des méthodes pour créer des zones hydrophiles au milieu d'une surface hydrophobe. La phase aqueuse d'intérêt est ensuite déposée sous forme de micro-gouttes par un système de dispense automatisé. Ces méthodes conduisent à la formation reproductible de gouttes et de matrices à haute densité de plots ou de gouttes.

Cependant, elles nécessitent toutes l'utilisation d'un système de dispense de gouttes incluant un dispositif de déplacement et d'alignement précis, ainsi qu'un dispositif pour l'alimentation en

liquide. Le coût de cet appareillage est élevé. En outre, la densité maximale des matrices est limitée par une combinaison entre la taille des gouttes dispensées et le pas minimal inter-plots du système de dispense.

5 Enfin, les zones hydrophiles décrites dans ces documents sont toujours des disques dont la surface représente également la zone de travail. De plus, ces systèmes ne sont pas utilisables dans le cadre d'une mesure ou d'une fonctionnalisation par voie électrique

10 car ces dispositifs n'ont pas d'électrode.

Pour la formation de matrices à haute densité de micro-cuvettes, deux exemples significatifs peuvent être cités : la formation d'un réseau de cuvettes micro-fabriquées par gravure dans une plaque de

15 silicium pour réaliser des amplifications d'ADN par PCR en micro-volumes de quelques picolitres, et la formation de puits ou de canaux par photolithographie sur des résines photosensibles déposées sur un substrat en plastique [3]. Avec ces techniques, le nombre de

20 puits varie de 100 à 9600 puits, avec des diamètres de 60 à 500 μm et des profondeurs de 5 à 300 μm .

Cependant, les bords de ces cuvettes ne laissant pas de séparation physique entre la phase liquide au sein de la cuvette et celle à l'extérieur,

25 autorisent donc des connexions entre les cuvettes, et donc des contaminations entre elles.

Une des applications les plus importantes de la présente invention est la détection électrique ou électrochimique de molécules biologiques présentes dans

30 un liquide d'intérêt avec amplification du signal par accumulation enzymatique.

En ce qui concerne la détection électrique ou électrochimique de tests biologiques, un grand nombre de systèmes de détection électrique ou électrochimiques décrits dans la littérature ne permet pas de descendre
5 sous le nanomolaire en termes de limite de détection, limitation souvent due au faible nombre d'électrons générés par chaque hybride.

Les systèmes faisant intervenir une accumulation enzymatique permettent d'abaisser cette
10 limite de détection aux environs du picomolaire du fait de l'amplification élevée du nombre d'espèces rédox à détecter présentes dans le milieu réactionnel [4]. Cependant, cette méthode d'amplification engendre un problème pour les systèmes multiplots connus
15 actuellement car le composé rédox diffuse et peut ainsi contaminer les plots voisins. Pour éviter ce problème, il est donc nécessaire de confiner chaque plot.

Dans ce but, la plupart du temps, l'utilisation de structures tridimensionnelles (utilisation de
20 compartiments) est recommandée dans la littérature. Par exemple, Infineon [6] propose des murs en polymères et un système de migration des molécules par des forces électriques, de manière à les confiner dans un volume défini et à éviter ainsi la contamination inter-plots.
25 Malheureusement, des problèmes de remplissage fluide peuvent être rencontrés avec ce genre d'approche lorsqu'on souhaite par exemple travailler en veine liquide très fine. Là aussi, un distributeur de goutte devient indispensable.

30 Il existe donc un réel besoin d'un dispositif permettant d'obtenir aisément une matrice de gouttes

haute densité à partir d'un liquide d'intérêt, utilisable sans aucun appareillage de dispense de gouttes, facile à fabriquer, permettant d'éviter efficacement des contaminations entre les gouttes, et
5 qui peut être utilisé de manière très souple avec tous les procédés actuellement connus de l'homme du métier pour analyser collectivement ou individuellement des micro-volumes, par exemple sur un laboratoire sur puce, qu'il s'agisse d'un procédé chimique, électrique ou
10 optique ou d'une combinaison de ces procédés.

Exposé de l'invention

La présente invention répond précisément à ce besoin, et à d'autres encore, expliqués ci-dessous, en
15 fournissant un dispositif de travail comprenant :

- un substrat comportant une surface active sensiblement non mouillante vis-à-vis d'un liquide d'intérêt,
- au moins une zone de capture localisée
20 d'une goutte dudit liquide d'intérêt formée sur ladite surface active,
- au moins une zone de travail arrangée avec la zone de capture de telle manière que la zone de travail soit recouverte au moins partiellement par la
25 goutte du liquide d'intérêt lorsque celle-ci est capturée par ladite zone de capture,
- des moyens d'approvisionnement en liquide d'intérêt permettant de laisser une goutte dudit liquide d'intérêt sur ladite zone de capture.

30 La présente invention répond encore à ce besoin, en fournissant une plaquette de travail

comprenant plusieurs dispositifs de travail conformes à la présente invention, identiques ou différents dans leur mode de réalisation.

La présente invention répond encore à ce besoin
5 en fournissant une puce biologique comprenant un dispositif de travail selon l'invention ou une plaquette selon l'invention.

La présente invention répond encore à ce besoin en fournissant un système comprenant un ou plusieurs
10 dispositif(s) de travail selon l'invention.

La présente invention répond encore à ce besoin en fournissant une boîte de travail comprenant :

- un conteneur comprenant des moyens pour l'introduction d'un liquide d'intérêt dans ce conteneur
15 et d'extraction du liquide d'intérêt de ce conteneur,
- un dispositif de travail selon l'invention ou une plaquette selon l'invention, placé(e) dans ledit conteneur,

les moyens d'introduction et d'extraction du
20 liquide d'intérêt du conteneur étant disposés de telle manière que lorsque le liquide d'intérêt est introduit dans le conteneur, il couvre la, au moins une, zone(s) de capture, puis lorsque le liquide d'intérêt est extrait du conteneur, une goutte dudit liquide
25 d'intérêt reste captive par ladite zone de capture.

La présente invention répond encore à ce besoin en fournissant un système comprenant une boîte de travail selon l'invention.

30 Dans le contexte de la présente invention, un liquide est dit « d'intérêt » dès lors que ce liquide

est destiné à être capturé par une ou plusieurs zone de capture d'un dispositif selon l'invention, par exemple pour former une matrice de gouttes de ce liquide.

Par « liquide d'intérêt », on entend tout
5 liquide susceptible de nécessiter une disposition en matrice de gouttes sur un support, par exemple dans un but analytique et/ou chimique et/ou biochimique. Par « but chimique et/ou biochimique », on entend toute réaction chimique et/ou biochimique qui peut être
10 réalisée dans un liquide. Par « but analytique », on entend toute analyse qualitative et/ou quantitative qui peut être réalisée dans un liquide.

Le liquide d'intérêt peut être organique ou aqueux. Il peut s'agir d'un quelconque des liquides
15 actuellement manipulés en laboratoire ou dans l'industrie, par exemple sur des laboratoires sur puce. Il peut s'agir par exemple d'un liquide choisi parmi une solution, un solvant, un réactif, un échantillon, un extrait cellulaire, un prélèvement provenant d'un
20 organisme animal ou végétal, un prélèvement effectué dans la nature ou dans l'industrie, etc. Il peut s'agir d'un liquide biologique ou chimique. Ce liquide d'intérêt peut être un liquide dilué, si nécessaire, pour son utilisation avec le dispositif de la présente
25 invention, comme cela peut se faire sur les laboratoires sur puce. Un produit solide peut être mis en solution pour constituer un liquide d'intérêt au sens de la présente invention. Ce produit solide peut être choisi par exemple parmi un produit chimique ou
30 biochimique, un réactif, un matériau à analyser, un prélèvement provenant d'un organisme animal ou végétal,

un prélèvement effectué dans la nature ou dans l'industrie, etc. L'homme du métier connaît la manipulation de tels produits et liquides d'intérêt.

Le substrat du dispositif de travail de l'invention constitue en fait le support sur lequel est formée la surface active, la, au moins une, zone de capture, et la, au moins une, zone de travail. Il peut être constitué de tout matériau approprié pour mettre en œuvre la présente invention. Il peut s'agir par exemple d'un des matériaux de base utilisés pour fabriquer les laboratoires sur puce, puces biologiques, microsystèmes, etc. Il peut s'agir par exemple d'un matériau choisi dans le groupe constitué du silicium ; de l'oxyde de silicium ; du verre ; du nitrure de silicium ; des polymères, par exemple des polymères organiques tels que ceux choisis dans le groupe comprenant les polycarbonates, les polydiméthylsiloxanes, les polyméthylmétacrylates, les polychlorobiphényles et les copolymères de cyclooléfines ; et d'un métal ou d'un alliage métallique, par exemple choisi parmi Al, Au, ou l'acier inox.

Par surface active, on entend surface du substrat sur laquelle est formée la, au moins une, zone de capture et la, au moins une zone, de travail arrangée avec ladite zone de capture. Selon l'invention, le substrat peut comporter une ou plusieurs surfaces actives. Selon l'invention, chaque surface active peut comprendre plusieurs zones de captures arrangées respectivement avec une ou plusieurs zone(s) de travail.

La surface active peut être constituée de tout matériau sensiblement non mouillant vis-à-vis du liquide d'intérêt et approprié pour mettre en œuvre la présente invention. En effet, le fonctionnement du dispositif de la présente invention repose en partie sur le fait que la surface active ne retient pas ou très peu le liquide d'intérêt, ce qui permet un dé-mouillage total, facile, sans rétention de liquide d'intérêt sur la surface, et ceci sans séchage. De préférence la surface active forme un angle de contact avec le liquide d'intérêt de au moins 60°. Ainsi, les gouttes de liquide d'intérêt sont capturées sélectivement et exclusivement par la, ou les, zone(s) de capture, et sont circonscrites à ces zones, ce qui évite tout problème de contamination entre les gouttes, et donc entre les zones de travail.

Le matériau de la surface active est donc choisi en fonction du liquide d'intérêt à partir duquel une matrice de gouttes doit être formée, mais aussi en fonction du substrat, et en fonction des zones de travail et de capture. Il peut être disposé sur le substrat par modification chimique ou par dépôt. Il peut s'agir également du substrat lui-même s'il est constitué d'un matériau à caractère sensiblement non mouillant vis-à-vis du liquide d'intérêt. Dans ce dernier cas, aucune modification chimique supplémentaire n'est requise.

Par exemple, lorsque le liquide d'intérêt est aqueux, le matériau formant la surface active est avantageusement hydrophobe. Par exemple, dans les exemples de matériaux précités constituant le substrat,

la surface du substrat peut être rendue non mouillante, ici hydrophobe, par modification chimique, par exemple par silanisation avec un silane porteur de fonctions hydrophobes, par exemple 1H, 1H, 2H, 2H-perfluorodécyl-
5 trichlorosilane. Il peut s'agir par exemple aussi d'un dépôt de téflon liquide sur plateau tournant ; d'une silanisation en phase gazeuse de silane hydrophobe ; de l'utilisation de silane hydrocarboné, par exemple du type octadécyltrichlorosilane. Les matériaux et
10 procédés utilisables pour la mise en œuvre de telles modifications chimiques sont connus de l'homme du métier. Un exemple de réalisation est donné ci-dessous.

Le traitement permettant de rendre la surface du substrat non mouillante vis-à-vis du liquide
15 d'intérêt peut être réalisé, avant ou après la formation de la, ou des, zone(s) de capture et/ou de la, ou des, zone(s) de travail correspondantes. Ces dernières seront protégées au cas où il est réalisé après celles-ci.

20 La forme et la taille de cette surface active, et donc aussi du substrat sur lequel elle est formée, n'ont pas d'importance pour le fonctionnement du dispositif de l'invention. Elles peuvent être déterminées par exemple en fonction du nombre de zones
25 de capture couplées à des zones de travail formées sur celle-ci, et éventuellement de leur disposition sur cette surface, ainsi qu'en fonction de la taille désirée du dispositif tel qu'il sera utilisé et des spécifications de coût. Toutefois, afin d'éviter des
30 rétentions non prévues du liquide d'intérêt sur la surface, de préférence, elle est choisie plane. Par

exemple, la surface active peut avoir une forme et une
taille comparables aux plaquettes utilisées pour la
fabrication de laboratoires sur puce et des
microsystèmes d'analyse et de détection connus de
5 l'homme du métier.

Selon l'invention, la surface active, ou le
substrat sur laquelle cette surface est formée, est
modifié par structuration ou traitement de surface afin
de créer les zones de capture et de travail du
10 dispositif de l'invention.

Les zones de capture sont des zones très
localisées, mouillantes vis-à-vis du liquide d'intérêt,
c'est-à-dire ayant une forte affinité pour ce liquide
d'intérêt. Le terme « localisé » est défini ci-dessus.
15 Par exemple, dans une utilisation basique du
dispositif, en faisant ruisseler un peu de liquide
d'intérêt sur la surface active, la zone de capture
capture, ou retient, une goutte de liquide d'intérêt,
alors que la surface active, sensiblement non
20 mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt, ne retient
pas ou très peu de liquide d'intérêt. En cessant le
ruissellement, seule la goutte de liquide d'intérêt
retenue localement par la zone de capture reste sur la
surface active.

25 Selon l'invention, la, au moins une, zone de
capture peut être une zone de capture chimique,
électrique ou physique d'une goutte de liquide
d'intérêt.

Par exemple, suivant un premier mode de
30 réalisation du dispositif de l'invention, la zone de
capture est constituée d'un matériau support qui est

disposé de manière déterminée sur ladite surface active ou sur le substrat et qui, si nécessaire, peut être modifié chimiquement pour le rendre mouillant vis-à-vis du liquide d'intérêt, par exemple par greffage sur
5 celui-ci d'une fonction chimique mouillante vis-à-vis dudit liquide d'intérêt.

Par exemple, ce matériau support peut être constitué d'un matériau choisi dans le groupe constitué du silicium, de l'oxyde de silicium (SiO_2) ; du verre ;
10 du nitrure de silicium (Si_3N_4) ; des polymères, par exemple des polymères organiques tels que ceux choisis dans le groupe comprenant les polycarbonates, les polydiméthylsiloxanes, les polyméthylmétacrylates, les polychlorobiphényles et les copolymères de
15 cyclooléfinés ; et d'un métal ou d'un métal ou d'un alliage métallique, par exemple choisi parmi Al, Au, ou l'acier inox.

Par exemple, la fonction chimique mouillante vis-à-vis d'un liquide d'intérêt aqueux peut être
20 choisie dans le groupe constitué d'une fonction alcool, alcoolate, acide carboxylique, carboxylate, acide sulfonique, sulfonate, oxyamine, hydrazine, amine et ammonium.

A titre d'exemple, les deux procédés suivants
25 (1) et (2) peuvent être utilisés pour fabriquer ce type de zone de capture :

(1) Sur un substrat choisi parmi les matériaux précités (par exemple isolant) on peut réaliser les étapes suivantes :

30 i) Dépôt par évaporation ou pulvérisation d'une ou de plusieurs couches de métaux (support)

choisis parmi Ti, Pt, Au, Pd, Ni, Al, etc. avec comme dernière couche obligatoire Au. Cependant, si la zone de travail est une microcellule électrochimique (voir ci-dessous), les électrodes de cette microcellule
5 seront préférentiellement pas en or.

ii) Définition de motifs dans la couche métallique par photolithographie puis gravure des métaux, par exemple dans un bain de gravure chimique, ou en phase gazeuse avec un plasma, pour former une
10 zone de capture.

iii) Dépôt d'un matériau isolant (SiO_2 ou Si_3N_4) sur tout le substrat puis définition de motifs par photolithographie et gravure localisée dans un bain de gravure chimique ou en phase gazeuse avec un plasma
15 pour enlever le matériau isolant sur les zones devant être en contact avec le liquide d'intérêt.

iv) Réalisation de la surface active non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt sur l'ensemble du substrat, par exemple pour le rendre
20 hydrophobe, par silanisation du SiO_2 ou du Si_3N_4 avec un silane porteur de fonctions hydrophobes, par exemple avec le 1H, 1H, 2H, 2H-perfluorodécyl-trichlorosilane ; puis la zone de capture obtenue est nettoyée, par exemple par voie chimique, par exemple avec une
25 solution de NaOH ; par voie électrochimique, par exemple par application d'un potentiel de 1,2V pendant 10s ; ou par plasma oxygène. La zone de travail si elle est déjà formée sur la surface est ensuite nettoyée si nécessaire par les mêmes moyens que ceux utilisés pour
30 la zone de capture.

v) Réalisation de la barrière hydrophile sur la zone de capture, ici en or, par physisorption de thiols, par exemple de la manière décrite dans le document [10], porteurs de fonctions mouillantes pour le
5 liquide d'intérêt auquel est destiné ce dispositif.

(2) Lorsque le substrat est choisi parmi SiO_2 ou Si_3N_4 , on peut aussi, par exemple, réaliser les étapes suivantes :

10 x) Réalisation de la surface active non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt sur l'ensemble du substrat, par exemple pour le rendre hydrophobe, par silanisation du SiO_2 ou du Si_3N_4 avec un silane porteur de fonctions hydrophobes, par exemple
15 avec le 1H, 1H, 2H, 2H-perfluorodécyl-trichlorosilane,

y) Définition de motifs par photolithographie puis destruction du silane hydrophobe par voie chimique, par exemple au moyen d'une solution de NaOH, ou au moyen d'un plasma pour former la zone où
20 sera formée la zone de capture (ou bande mouillante),

z) Réalisation de la zone de capture par exemple par silanisation avec un silane porteur de fonctions mouillantes pour le liquide d'intérêt auquel est destiné ce dispositif, par exemple avec des silanes
25 porteurs de fonctions mouillantes pour les solutions aqueuses décrites précédemment par exemple le silane μ -aminopropyl triéthoxysilane. Le document [9] expose des procédés utilisables.

30 Par exemple, suivant un deuxième mode de réalisation du dispositif de l'invention, en

particulier lorsque le dispositif de l'invention est destiné à être utilisés avec des liquides d'intérêt aqueux et lorsque la surface active ou le substrat est à base de silicium, la zone de capture peut être
5 constituée de silicium noir hydrophile, qui peut être formé très facilement sur une telle surface par gravure. La zone gravée devient alors particulièrement mouillante vis-à-vis d'un liquide d'intérêt aqueux. La zone gravée ne nécessite pas d'autre modification
10 chimique pour être mouillante. Ce mode de réalisation est donc très économique. Le document [11] expose un exemple de protocole de laboratoire pouvant être utilisé pour fabriquer ce type de zones de capture.

15 Par exemple, suivant un troisième mode de réalisation du dispositif de la présente invention, la zone de capture peut être une électrode de capture par mouillage. Suivant ce mode de réalisation de la présente invention, la zone de capture, ici une
20 électrode, peut être constituée par exemple d'un matériau choisi dans le groupe constitué des métaux nobles, par exemple Au, Pt, Pd, Ti, Ni, Al, etc., ou un alliage de métaux nobles ; de carbone ; de graphite ; et d'oxyde d'indium et d'étain (ITO) ; ledit matériau
25 étant rendu mouillant par électrodéposition sur celui-ci d'un polymère conducteur d'électricité sur lequel est fixée une fonction chimique mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt.

Selon l'invention, le polymère conducteur
30 d'électricité peut être un des polymères utilisés dans la fabrication des laboratoires sur puce. Il peut être

choisi par exemple dans le groupe constitué du polypyrrole, de la polyaniline, du polyazulène, d'un polythiophène, du polyindole, du polyfurane, et du polyfluorène. La fonction chimique mouillante peut être
5 par exemple une des fonctions chimiques mouillantes citées ci-dessus. Sa fixation sur le monomère avant polymérisation ou sur le polymère une fois qu'il est formé peut être effectuée par les techniques classiques de chimie.

10 Un exemple de procédé de fabrication de ce type de zone de capture peut être résumé ainsi :

(3) Sur un substrat (isolant) choisi parmi les matériaux tels que SiO_2 ou Si_3N_4 , verre, polymère, on peut réaliser les étapes suivantes :

15 a) Dépôt par évaporation ou pulvérisation d'une ou de plusieurs couches de métaux (support) choisis parmi les métaux précités, avec comme dernière couche un métal choisi parmi Pt et Au ou tout autre métal noble ou un alliage de ces métaux. Cela peut
20 également être un dépôt de carbone, graphite, ITO, etc.

B) Définition de motifs dans la couche métallique par gravure des métaux, par exemple dans un bain de gravure chimique, ou en phase gazeuse avec un plasma, pour former une ou plusieurs électrode(s) et
25 une ou plusieurs bande(s) métallique(s) d'arrivée de courant.

c) Protection de la ou des bande(s) métallique(s) d'arrivée du courant par dépôt d'un matériau isolant (SiO_2 ou Si_3N_4) puis définition de
30 motifs par photolithographie puis gravure localisée dans un bain de gravure chimique ou en phase gazeuse

avec un plasma pour enlever le matériau isolant sur les zones devant être fonctionnalisées ou en contact avec le liquide d'intérêt.

μ) Réalisation de la surface active non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt sur l'ensemble du substrat, par exemple pour le rendre hydrophobe, par silanisation du SiO_2 ou du Si_3N_4 avec un silane porteur de fonctions hydrophobes, par exemple avec le 1H, 1H, 2H, 2H-perfluorodécyl-trichlorosilane. Les électrodes sont ensuite nettoyées, par exemple par voie chimique, par exemple avec une solution de NaOH ; par voie électrochimique, par exemple par application d'un potentiel de 1,2V pendant 10s ; ou par plasma. La zone de travail si elle est déjà formée sur la surface est ensuite nettoyée si nécessaire par exemple par les mêmes moyens utilisés pour l'électrode.

μ) Réalisation de la barrière hydrophile sur l'électrode la plus externe dans le cas où on a plusieurs électrodes par dispositif selon l'invention (cas où la zone de travail est une microcellule électrochimique) par électropolymérisation en conditions potentiostatiques, galvanostatiques ou en balayages récurrents d'un polymère conducteur d'électricité porteur de fonctions mouillantes pour le liquide d'intérêt auquel est destiné le dispositif. Des exemples de polymères et fonctions mouillantes sont donnés ci-dessus.

Par exemple, suivant un quatrième mode de réalisation du dispositif de la présente invention, la zone de capture peut être une électrode de capture par

électro-activation de fonctions chimiques. Ce mode de réalisation est sensiblement identique au troisième mode de réalisation précité, mis à part que les fonctions chimiques mouillantes utilisées sont choisies de telle manière qu'elles puissent être électro-activées ou électro-désactivées. Ainsi, par exemple dans le cas de fonctions chimiques électro-activables, il est nécessaire d'appliquer un courant électrique à l'électrode constituant la zone de capture pour que les fonctions chimiques mouillantes de cette électrode soient activées et capturent une goutte du liquide d'intérêt. En interrompant l'application du courant électrique, les fonctions mouillantes sont désactivées, et la goutte de liquide d'intérêt est relâchée. Ce mode de réalisation permet avantageusement de placer sur les zones de travail, après la première goutte de liquide d'intérêt, une goutte d'un deuxième liquide d'intérêt (et ainsi de suite), par exemple de rinçage ou contenant des réactifs chimiques permettant de réaliser une analyse ou une modification chimique d'analytes ou d'éléments présents à l'origine dans le premier liquide d'intérêt puis liés à des sondes fixées sur la zone de travail. La zone de travail peut alors constituer un véritable microréacteur sur lequel des étapes successives d'un protocole utilisant différentes solutions peut être mises en œuvre.

Suivant un cinquième mode de réalisation, la zone de capture peut être une zone de capture par électro-mouillage. Dans ce mode de réalisation, l'électro-mouillage permettant de capturer une goutte de liquide d'intérêt consiste à appliquer un potentiel

entre deux électrodes, dont une est couverte d'un matériau isolant et non mouillant. Une goutte de liquide placée entre ces deux électrodes va venir mouiller la surface non mouillante. Dans les systèmes
5 actuels, avec deux électrodes en vis-à-vis, il est possible de retenir un liquide localement grâce à ce système. Le document référencé [7] expose des protocoles utilisables pour mettre en œuvre ce cinquième mode de réalisation de la présente invention.

10

Par exemple, suivant un sixième mode de réalisation du dispositif de la présente invention, la zone de capture peut être une gravure de, ou une saillie sur, la surface active permettant de capturer
15 la goutte par des forces capillaires. Ces gravures ou saillies peuvent être réalisées par exemple par gravure directe du substrat ; par dépôt d'un matériau à la surface d'un substrat plan, par exemple par couchage, évaporation, pulvérisation, ou dépôt électrochimique,
20 puis gravure en conjonction avec un procédé classique de photolithographie, par exemple par couchage de résine, insolation et définition de motifs, ou gravure ; par définition directe de motifs par photolithographie dans des polymères photosensibles,
25 par exemple dans le cas de résines photosensibles ; moulage ou emboutissage de matériaux plastiques. L'essentiel est que ces gravures ou saillies formant des zones permettent de capturer, de manière localisée à cette zone, par capillarité, une goutte du liquide
30 d'intérêt et que cette goutte recouvre au moins partiellement la zone de travail.

Quel que soit le mode de réalisation choisi, lorsque le liquide d'intérêt est aqueux, la zone de capture est de toute préférence une zone hydrophile et
5 la surface active sensiblement non mouillante est de toute préférence hydrophobe.

Quel que soit le mode de réalisation choisi, avantageusement, la zone de capture et la, ou les, zone(s) de travail correspondante peuvent être placées
10 dans un creux (ou cuvette) ou sur une saillie (ou plot) par rapport à la surface active. Ainsi, la zone de capture et la zone de travail correspondante sont en relief par rapport à la surface active, soit sur des plots, soit dans des cuvettes. Cela peut permettre de
15 mieux circonscrire la goutte capturée par chaque zone de capture, et ainsi d'améliorer encore les propriétés du dispositif de l'invention en ce qui concerne la non contamination entre les zones de travail. Ce type de creux ou saillie existe par exemple dans les
20 laboratoires sur puces actuelles. Cependant, dans la présente invention, ces creux et saillies seront suffisamment éloignés les uns des autres, particulièrement lorsqu'il s'agit de saillies, et de diamètre suffisant, particulièrement lorsqu'il s'agit
25 de creux, de manière à ce que le liquide d'intérêt ne soit pas capturé par ceux-ci par capillarité entre les saillies ou dans les creux, mais bien par les zones de capture situées sur ces saillies ou dans ces creux. Ils peuvent être obtenus par emboutissage, moulage,
30 gravure, ou toute autre technique connue de l'homme du métier et adaptée au matériau constituant le substrat

sur lequel la surface active de la présente invention est formée.

Selon l'invention, la zone de capture peut avoir n'importe quelle forme. Cette zone peut être
5 choisie, à titre d'exemple, parmi une forme annulaire, en étoile, en rectangle, en carré, en triangle, en ellipse, ou en polygone ayant de 4 à 20 côtés, ou toute autre forme convenant à la mise en œuvre de la présente invention. De préférence, la forme est annulaire,
10 ouverte ou fermée. En général, elle est sous forme de bande. Généralement, cette bande a une largeur et une épaisseur qui sont fonction de la taille du dispositif dans son ensemble (zone de capture + zone de travail). En effet, cette largeur et cette épaisseur doivent
15 permettre la capture d'une goutte de liquide d'intérêt. Des exemples de dimensions sont donnés ci-dessous. Quoiqu'il en soit, selon l'invention, la zone de capture est arrangée avec la zone de travail de telle façon que si une goutte de liquide d'intérêt est capturée par
20 celle-ci, cette goutte recouvre au moins partiellement la zone de travail. De préférence, selon l'invention, la zone de capture entoure la zone de travail, ceci de manière continue ou discontinue.

Par ailleurs, selon un mode particulier de
25 réalisation du dispositif de la présente invention, une zone de capture d'une goutte de liquide d'intérêt peut entourer plusieurs zones de travail, par exemple de 2 à 4 ou plus, pourvu que lorsqu'une goutte de liquide d'intérêt est capturée par la zone de capture, cette
30 goutte recouvre, au moins partiellement, toutes les

zones de travail qui sont entourées par cette zone de capture.

Par zone de travail, on entend une zone au niveau de laquelle des opérations physiques et/ou chimiques et/ou optiques peuvent être menées dans la goutte capturée par la zone de capture avec laquelle elle est arrangée. Ainsi, selon l'invention, la, au moins une, zone de travail peut être une zone d'interaction choisie parmi une zone d'interaction électrique, chimique, mécanique, optique avec ladite goutte de liquide d'intérêt capturée, ou une zone au niveau de laquelle plusieurs de ces interactions sont utilisées simultanément ou successivement.

Ainsi, suivant une première forme de réalisation de l'invention, la zone de travail peut être une zone d'interaction électrique, par exemple une microcellule électrochimique.

Une microcellule électrochimique est un dispositif possédant au moins deux électrodes préférentiellement coplanaires, formant une électrode de travail et une contre-électrode. Elle peut également posséder une électrode de référence. Ces éléments sont connus de l'homme du métier. Les procédés de fabrication connus de l'homme du métier sont utilisables pour fabriquer cette zone de travail, par exemple le procédé décrit dans le document référencé [8].

Grâce à cette forme de réalisation, le dispositif de la présente invention peut constituer un véritable microréacteur électrochimique qui utilise la

goutte de liquide d'intérêt capturée par la zone de capture comme milieu réactionnel, et plus précisément comme milieu électrochimique. Le réacteur électrochimique suivant cette première forme de
5 réalisation de la présente invention peut être utilisé pour réaliser toute réaction et/ou analyse électrochimique connue de l'homme du métier.

Ce réacteur peut servir par exemple à effectuer des réactions d'électropolymérisation localisée d'un ou
10 de plusieurs monomère(s) présent(s) dans la goutte (polymérisation ou copolymérisation) et/ou d'électro-greffage localisé d'une ou de plusieurs molécule(s) chimique(s) présente(s) dans la goutte du liquide d'intérêt sur une des électrodes de la microcellule.
15 Dans cet exemple, le liquide d'intérêt est alors un liquide contenant les réactifs nécessaires à l'électropolymérisation ou à l'électrogreffage désiré. La polymérisation et le greffage peuvent être avantageusement localisés au niveau de la goutte du
20 liquide d'intérêt capturée par la zone de capture. De telles réactions d'électropolymérisation ou greffage localisés peuvent être utilisées par exemple pour la fabrication de puces biologiques ou systèmes d'analyse.

Ce microréacteur électrochimique peut servir
25 par exemple aussi à effectuer des analyses électrochimiques, qualitatives et/ou quantitatives, d'analytes présents dans la goutte d'un liquide d'intérêt capturée par la zone de capture. Il peut servir par exemple aussi à effectuer des analyses
30 électrochimiques, qualitatives et/ou quantitatives, d'une reconnaissance moléculaire sonde/cible, la sonde

étant fixée sur la zone de travail, et la cible se trouvant dans la goutte du liquide d'intérêt capturée.

Dans un exemple particulier, la microcellule électrochimique du dispositif de l'invention peut être
5 utilisée d'abord pour « fabriquer » la zone de travail, et ensuite pour utiliser cette zone de travail pour l'analyse d'une goutte d'un liquide d'intérêt. Par exemple, si la zone de travail doit comprendre un polymère organique fonctionnalisé par une sonde, par
10 exemple une sonde biologique, elle peut être fabriquée par électropolymérisation d'un polymère conducteur fonctionnalisé par une sonde, par exemple suivant le procédé décrit dans le document référencé [5]. La particularité liée à l'utilisation du dispositif de
15 l'invention est qu'on utilise la zone de capture pour capturer de manière localisée sur la zone de travail une première goutte d'un premier liquide d'intérêt contenant les réactifs nécessaires à l'électropolymérisation (monomère organique). La
20 fonctionnalisation par la sonde, peut être réalisée simultanément à l'électropolymérisation, le premier liquide d'intérêt contient alors aussi la sonde (par exemple monomère fonctionnalisé par la sonde). La fonctionnalisation peut aussi être réalisée
25 postérieurement à l'électropolymérisation au moyen d'une deuxième goutte d'un deuxième liquide d'intérêt (contenant la sonde) capturée par la même zone de capture et, de ce fait localisée sur la même zone de travail. En outre, la zone de travail ainsi fabriquée
30 peut ensuite être séchée, et elle peut servir, toujours grâce à la zone de capture avec laquelle elle est

arrangée, à capturer une goutte d'un troisième liquide d'intérêt à analyser, contenant une cible qui interagit avec la sonde (par exemple oligonucléotides complémentaires). Un quatrième liquide d'intérêt peut
5 encore être utilisé pour analyser (détection et/ou dosage) l'interaction sonde/cible sur ladite zone de travail, et ainsi de suite.

Dans un exemple particulier, où la microcellule électrochimique d'un dispositif de la présente
10 invention est utilisée pour détecter une cible présente dans un échantillon liquide, par exemple en mettant en jeu une interaction de la cible à détecter avec une sonde spécifique fixée sur la zone de travail, il est possible de détecter électrochimiquement ladite
15 interaction par exemple avec amplification du signal par accumulation enzymatique dans une goutte d'un liquide d'intérêt, contenant un substrat enzymatique, capturée par la zone de capture arrangée avec cette zone de travail. Le document [4] expose un protocole
20 opératoire utilisable pour ce type de détection, avec le dispositif de la présente invention.

La détection d'une interaction sonde/cible sur la zone de travail peut faire intervenir un des autres moyens connus de l'homme du métier que la cellule
25 électrochimique, par exemple un procédé optique. La microcellule électrochimique peut donc servir dans ce cas uniquement à « fabriquer » la zone de travail, la détection d'une interaction sonde/cible étant ensuite effectuée par un autre moyen.

30 Dans ces exemples, différentes gouttes constituées de différents liquides d'intérêt sont donc

capturées successivement par une même zone de capture sur le dispositif de la présente invention à différentes fins, par exemple pour réaliser des étapes successives d'un protocole de fabrication de la zone de travail, par exemple aussi pour réaliser des étapes successives de détection et/ou de dosage d'un analyte dans un liquide d'intérêt. L'avantage lié à la présente invention est que quel que soit l'objectif des captures successives de gouttes de liquides d'intérêt, les gouttes capturées successivement sont toutes localisées sur les zones de travail, grâce à leur zone de capture respective.

Quelle que soit la mise en œuvre de cette forme de réalisation caractérisée par la présence d'une microcellule électrochimique, la sonde qui fonctionnalise la zone de travail peut être choisie par exemple dans le groupe constitué par une enzyme, un substrat d'enzyme, un oligonucléotide, un oligonucléoside, une protéine, un récepteur membranaire d'une cellule eucaryote ou procaryote, un anticorps, un antigène, une hormone, un métabolite d'un organisme vivant, une toxine d'un organisme vivant, polynucléotide, polynucléoside, ADN complémentaire. Elle est bien entendu choisie en fonction de la cible avec laquelle elle devra interagir.

Avantageusement, suivant cette première forme de réalisation du dispositif de l'invention, l'électrode la plus externe de la microcellule, peut être utilisée pour former la zone de capture ou bande mouillante du dispositif de l'invention. Dans ce cas, comme exposé ci-dessus, un polymère conducteur porteur

de la fonction mouillante destiné à former la zone de capture est déposé sur cette électrode. Pour ce dépôt, le polymère peut être électro-déposé sur l'électrode grâce à la cellule électrochimique formant la zone de travail. Des procédés utilisables pour déposer un polymère conducteur sur une électrode et y lier une fonction chimique mouillante sont décrits ci-dessus dans le troisième mode de réalisation de la zone de capture selon l'invention. La forme de cette électrode n'a pas d'importance dès lors qu'elle entoure la zone de travail conformément à la présente invention.

Selon l'invention, l'électrode formant la zone de capture d'une goutte de liquide d'intérêt peut fonctionner de manière totalement indépendante de la zone de travail. Elle peut aussi fonctionner de manière dépendante en étant utilisée par la suite dans la fonction de la microcellule électrochimique, par exemple pour effectuer des mesures électrochimiques et/ou des réactions électrochimiques dans la goutte capturée. La zone de capture du dispositif de la présente invention peut donc être active ou non suivant le choix de mise en oeuvre du dispositif de l'invention.

Avantageusement aussi, l'électrode de capture d'une goutte de liquide d'intérêt peut en outre être fonctionnalisée par une sonde destinée à interagir avec une cible. Par exemple, lorsque la zone de capture est constituée suivant le troisième mode de réalisation de la présente invention, le polymère conducteur fonctionnalisé par une fonction chimique mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt peut également être, en

outre, fonctionnalisé par ladite sonde destinée à interagir avec une cible. La sonde est définie ci-dessus pour la zone de travail. Les procédés connus de l'homme du métier pour fonctionnaliser un polymère conducteur par une sonde pour la fabrication de puces biologiques sont utilisables pour la fabrication de cette zone de capture particulière de la présente invention. Il peut s'agir à titre d'exemple des procédés exposés dans les documents précités.

10

Suivant une deuxième forme de réalisation de l'invention, la zone de travail peut être une zone d'interaction chimique avec la goutte de liquide d'intérêt capturée, sans microcellule électrochimique.

15 La zone de travail peut par exemple comporter des fonctions ou des réactifs chimiques ou biologiques prêts à réagir avec une cible de ces fonctions ou de ces réactifs présente dans un liquide d'intérêt. De même que pour la première forme de réalisation, le

20 dispositif de l'invention peut servir dans un premier temps à placer ces fonctions ou ces réactifs sur la zone de travail, et dans un deuxième temps, après séchage, à capturer une goutte de liquide d'intérêt contenant la cible de ces fonctions ou de ces réactifs

25 pour son analyse. De même que pour la première forme de réalisation, plusieurs liquides d'intérêt pourront se succéder sur le dispositif de l'invention, par exemple pour réaliser des étapes successives d'un protocole de fabrication de la zone de travail, par exemple aussi

30 pour réaliser des étapes successives de détection et/ou

de dosage d'un analyte dans un liquide d'intérêt. Les avantages sont les mêmes que ceux précités.

Cette zone de travail peut être choisie parmi celles connues de l'homme du métier dans le domaine des
5 puces biologiques (puces commercialisées par AGILENT, CIPHERGEN, EUROGENTEC). La différence du dispositif de la présente invention avec ces puces de l'art antérieur réside surtout en la présence de la zone de capture d'une goutte de liquide d'intérêt arrangée avec ladite
10 zone de travail. Cette zone de travail peut être fabriquée par exemple par silanisation puis immobilisation de sondes biologiques comme cela est décrit par exemple dans le document référencé [12].

Cette zone de travail peut être par exemple une
15 zone comportant un polymère fonctionnalisé par une sonde biologique telles que celles précitées, dans le but de fixer une cible correspondante susceptible d'être présente dans un liquide d'intérêt pour la détecter, par exemple optiquement. Par exemple, sur un
20 substrat tels que ceux précités, cette zone de travail peut être obtenue selon des méthodes décrites dans le document référencé [13]. Les puces ainsi fonctionnalisées peuvent ensuite, grâce à la zone de capture du dispositif de l'invention, servir à capturer
25 une goutte d'un échantillon à analyser puis éventuellement d'un autre liquide d'intérêt pour mettre en évidence une interaction sonde/cible.

Suivant une troisième forme de réalisation de
30 l'invention, la zone de travail peut posséder des dispositifs actifs ou de mesure, tels que des capteurs

ou des actionneurs. Cette forme de réalisation peut s'ajouter aux formes de réalisation et variante précitées, ou être exclusive suivant l'objectif visé dans la mise en œuvre de la présente invention. Les
5 dispositifs actifs ou de mesure sont avantageusement situés au centre des zones de capture.

Lorsque la zone de travail comprend un capteur, il peut être choisi par exemple dans le groupe constitué des capteurs électriques, magnétiques,
10 électrostatiques, mécaniques (par exemple capteur de pression), thermiques (par exemple capteurs de température), optiques (par exemple dispositif de détection optique) et chimiques.

Lorsque la zone de travail comprend un
15 actionneur, il peut être choisi par exemple dans le groupe constitué des actionneurs optiques (source lumineuse), électriques, magnétiques, électrostatiques, mécaniques (déplacement mécanique), thermiques (résistance chauffante) et chimiques.

20 De tels capteurs et actionneurs, utilisables pour la mise en œuvre de la présente invention, ainsi que leur procédé de fabrication sont connus de l'homme du métier, notamment dans le domaine des microsystèmes. Là encore, la différence du dispositif de la présente
25 invention avec ces puces de l'art antérieur réside notamment en la présence de la zone de capture du liquide d'intérêt arrangée avec ladite zone de travail.

Quelle que soit la forme de réalisation, selon
30 l'invention, la, au moins une, zone de travail peut être une zone sensiblement non mouillante ou mouillante

vis-à-vis du liquide d'intérêt. Les inventeurs ont en effet noté au cours de leurs expérimentations que la mouillabilité de la zone de travail n'est pas déterminante pour le fonctionnement du dispositif de la présente invention. Ils ont en effet remarqué que, de manière tout à fait inattendue, le dispositif de la présente invention peut aussi fonctionner lorsque la zone de travail est non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt, pourvu que la goutte capturée recouvre au moins partiellement ladite zone de travail.

La présente invention se rapporte également à un procédé de fabrication du dispositif de la présente invention comprenant les étapes suivantes :

- fournir un substrat comportant une surface choisie pour devenir la surface active,
- structurer la surface choisie du substrat afin de former sur celle-ci une zone de travail,
- appliquer un traitement sur la surface choisie afin de la rendre sensiblement non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt auquel le dispositif est destiné, et
- structurer la surface choisie afin de former une zone de capture d'une goutte de liquide d'intérêt,

les étapes de structuration de la surface pour former une zone de travail et de structuration de la surface pour former la zone de capture étant réalisées afin que la zone de travail soit arrangée avec la zone de capture de telle manière que lorsque la zone de capture capture une goutte de liquide d'intérêt, la

zone de travail étant recouverte au moins partiellement par ladite goutte.

Le substrat, la structuration pour former la zone de travail, le traitement de la surface du substrat destiné à la rendre sensiblement non mouillante, et la structuration de la surface destinée à former la zone de capture d'une goutte de liquide d'intérêt sont définis ci-dessus.

Ainsi, par exemple, l'étape consistant à structurer la surface pour former la zone de capture peut consister à former une électrode destinée à former la zone de capture, à électro-déposer sur cette électrode un polymère conducteur, porteur d'une ou plusieurs fonction(s) chimique(s) mouillante(s).

Ainsi, par exemple, l'étape consistant à structurer la surface pour former la zone de travail peut consister : à fabriquer sur cette surface un capteur ; un actionneur ; une microcellule électrochimique ; une couche de polymère fonctionnalisée, ou qui peut être fonctionnalisée, avec une sonde destinée à reconnaître une cible susceptible d'être présente dans le liquide d'intérêt.

Ces étapes et les matériaux utilisables sont décrits ci-dessus.

25

La présente invention se rapporte également à une plaquette de travail comprenant plusieurs dispositifs de travail selon l'invention identiques ou différents. En effet, le dispositif de la présente invention, tel qu'il est présenté ci-dessus, peut être disposé en série sur une plaque, par exemple pour

30

former une matrice, les zones de travail pouvant être identiques sur toute la plaquette, ou différentes, par exemple pour pouvoir effectuer des analyses multiparamétriques et des réactions chimiques et biologiques différentes d'une zone à l'autre, simultanément ou successivement. La plaque peut être constituée du substrat comportant la ou les surface(s) active(s) définie(s) dans la présente. Le terme « matrice » est défini ci-dessus. Le nombre de dispositifs sur une plaquette de travail selon l'invention dépend notamment du nombre d'analyses à effectuer sur cette plaquette. Par exemple, si la plaquette comporte 1000 dispositifs selon l'invention, elle va permettre de capturer 1000 gouttes de liquide d'intérêt sur 1000 zones de travail, ou plus lorsqu'une zone de capture entoure plusieurs zones de travail, et donc de réaliser simultanément au moins 1000 analyses du liquide d'intérêt. Elle trouve donc par exemple une utilité pour mettre en œuvre une analyse multiparamétrique simultanée du liquide d'intérêt. Elle permet notamment de fabriquer des laboratoires sur puce, par exemple des puces biologiques et microsystèmes d'analyse.

La présente invention se rapporte donc également à une puce biologique comprenant un dispositif ou une plaquette selon l'invention. Cette puce peut être par exemple une puce à acide nucléique, une puce à anticorps, une puce à antigènes, une puce à protéine, une puce à cellules, ou une puce comprenant plusieurs de ces fonctions, par exemple une puce à

acide nucléique et à protéine, une puce à anticorps et à acide nucléique, etc.

Le dispositif de la présente invention pouvant être miniaturisé à l'échelle millimétrique ou micrométrique, à titre d'exemple, de 5 μm à 5 mm. La présente invention se rapporte également à un système comprenant un ou plusieurs dispositif(s) de travail selon l'invention, identiques ou différents, ou une plaquette selon l'invention. Le système peut être par exemple un microsystème d'analyse, par exemple un microsystème d'analyse totale (MicroSystème d'Analyse Totale ou μTAS).

La fabrication de la plaquette, et du système conformes à la présente invention peut être réalisée de la même manière que celle exposée ci-dessus pour la fabrication du dispositif de l'invention. Pour les parties de ces puces et systèmes qui sont distinctes de la présente invention, les procédés connus de l'homme du métier sont utilisables. En effet, la différence du dispositif, plaquette, laboratoire sur puce, et système de la présente invention avec leurs homologues de l'art antérieur réside essentiellement en la présence de la zone de capture de liquide d'intérêt arrangée avec chaque zone de travail. Aucune contrainte n'est imposée sur le choix du (ou des) matériau(x), ce choix étant guidé essentiellement par l'application envisagée et par les spécifications de coût : matériau classique de microélectronique utilisés pour les microsystèmes (silicium, verre, oxyde de silicium, nitruure de silicium, etc.), matériau composite de type

polymère technique disponible pour les circuits imprimés, etc.

Dans le domaines des microsystemes, où la dimension caractéristique du dispositif de l'invention est proche de 100 μm , l'orientation du dispositif n'a pas d'importance car les forces de gravité deviennent négligeables devant les forces de capture de la goutte par les zones de capture issues d'interactions à courte distance. En revanche, pour des applications visant des échelles de taille plus élevées pour la mise en œuvre de la présente invention, le dispositif de l'invention est bien entendu préférentiellement placé horizontalement avec une structuration de la surface active pour former les zones de capture et de travail vers le haut.

Dans la mise en œuvre de la présente invention, les dimensions d'une zone de capture peuvent varier largement en fonction de l'utilisation à laquelle est destinée et du mode de réalisation (une ou plusieurs zones de travail par zone de capture, un ou plusieurs dispositif(s) de l'invention sur une surface active). Par exemple pour un microsysteme, la zone de capture peut avoir un diamètre allant de 5 μm à 5 mm. Lorsque la zone de capture est sous forme de bande, cette bande peut avoir une largeur de 1 μm à 500 μm et une épaisseur par rapport à la surface active de 0 à 500 μm . La zone de travail, dont la dimension dépend notamment de la zone de capture (la goutte capturée devant recouvrir au moins partiellement cette zone de travail) peut avoir par exemple, avec les dimensions précitées de la zone de capture, un diamètre tel qu'il

touche la zone de capture qui l'entoure ou non. Par exemple, la zone de travail peut avoir un diamètre de 5 μm à 5 mm.

Pour que la, ou les, zone(s) de capture
5 capturent une goutte de liquide d'intérêt, il est nécessaire de mettre en contact le liquide d'intérêt avec ladite ou lesdites zones de capture. Pour cela, il est possible par exemple de faire ruisseler le liquide d'intérêt sur la ou les zone(s) de capture ou
10 d'immerger cette (ces) dernière(s) dans le liquide d'intérêt. Selon l'invention, les moyens permettant de laisser une goutte de liquide d'intérêt sur ladite zone de capture localisée peuvent être une seringue, une pipette, une micropipette, un récipient contenant le
15 liquide d'intérêt et dans lequel le dispositif ou la plaquette de l'invention peut être plongé, etc. Il peut s'agir également d'un distributeur d'une goutte de liquide d'intérêt par zone de capture. En effet, dans ce cas, le dispositif de l'invention permet de garantir
20 qu'il n'y a pas de contamination entre les zones de travail. Les distributeurs utilisables sont ceux habituellement utilisés par exemple dans le domaine des laboratoires sur puce et des microsystèmes.

La présente invention se rapporte également à
25 une boîte de travail telle qu'elle est définie ci-dessus.

Dans cette boîte de travail, le conteneur peut être ouvert ou fermé. Ce conteneur peut être utilisé spécialement pour immerger le dispositif de l'invention
30 ou la plaquette de l'invention dans le liquide d'intérêt, ou un conteneur qui permet en plus de

confiner le dispositif ou la plaquette de l'invention et/ou d'effectuer des analyses sur ou dans les gouttes capturées sur les zones de travail. Dans ces deux derniers cas, le conteneur est de préférence fermé, la
5 boîte de travail de la présente invention constitue alors un véritable laboratoire miniature. Elle pourra être utilisée dans des systèmes, tels que des microsystèmes d'analyse, ou former une puce biologique par exemple choisie dans le groupe constitué des puces
10 à acide nucléique, à anticorps, à antigènes, à protéine et à cellules.

Les dimensions du conteneur dépendent notamment des dimensions du dispositif de l'invention, ou de la plaquette de l'invention, qui doit être enfermé dans
15 celui-ci, mais aussi, le cas échéant, d'autres dispositifs d'analyse ou systèmes qui peuvent être joints dans ledit conteneur, par exemple d'autres laboratoires sur puce. Elles peuvent descendre en dessous du cm pour leur côté le plus grand.

20 Le conteneur peut être constitué par exemple d'un matériau choisi dans le groupe constitué par un polymère organique, une matière plastique élastomère, un verre, du métal, du silicium, une résine photosensible, ou par tout matériau connu de l'homme du
25 métier et permettant la mise en œuvre de la présente invention. Par exemple, il peut s'agir d'un des matériaux précités formant le substrat du dispositif de travail de la présente invention. Le matériau du conteneur est généralement choisi en fonction du type
30 de liquide d'intérêt à introduire dans celui-ci, de l'utilisation du conteneur (simplement immersion du

dispositif ou de la plaquette, ou immersion et analyse)
et en fonction des spécifications de coût du
fabriquant. Il peut s'agir d'un matériau identique à la
surface active du dispositif de l'invention ou
5 différent.

Le conteneur est de préférence suffisamment
étanche pour éviter par exemple les fuites lors de
l'immersion dans celui-ci du dispositif ou de la
plaquette selon l'invention dans le liquide d'intérêt.
10 En particulier, lorsqu'il est fermé, il est de
préférence suffisamment étanche pour empêcher, par
exemple, que des contaminations entrent dans le
conteneur, par exemple bactérienne, chimiques, etc. ;
et/ou pour empêcher l'évaporation de la, ou des,
15 goutte(s) capturée(s) par la, ou les, zone(s) de
capture après l'extraction du liquide d'intérêt du
conteneur. L'homme du métier saura adapter l'étanchéité
et utiliser les matériaux appropriés suivant
l'utilisation qu'il fait de la présente invention.

20 Selon un mode de réalisation particulier de la
boîte de travail de la présente invention, lorsque le
substrat et le conteneur sont constitués d'un même
matériau, le substrat peut constituer une des parois
constituant le conteneur.

25 Les parois constituant le conteneur peuvent
aussi être montées à partir de, et sur, la surface
active du dispositif de l'invention, par exemple par
collage ou compression.

Le conteneur peut comprendre un capot pour son
30 montage, mais aussi, dans certaines applications, pour
l'ouvrir ou le fermer, notamment afin de pouvoir

retirer de celui-ci le dispositif ou la plaquette de l'invention après l'avoir mis en contact avec le liquide d'intérêt, ou après les analyses ou réactions dans les gouttes. En effet, un seul conteneur peut également servir pour immerger en même temps ou successivement un, ou, suivant sa conception, plusieurs dispositif(s) ou plaquette(s) selon l'invention. Le conteneur peut alors comprendre des moyens de fixation amovibles, par exemple des clips, du, ou des, dispositif(s) et/ou plaquette(s) à l'intérieur de celle-ci. Si le conteneur comprend un capot, il sera de préférence suffisamment étanche pour ne pas perturber l'immersion du dispositif ou de la plaquette de l'invention, comme cela est expliqué ci-dessus.

Le capot peut être constitué d'un matériau tel que ceux précités pour le conteneur. Il peut être fabriqué par exemple par moulage, par emboutissage, par gravure ou par érosion mécanique, etc. Il peut ensuite être fixé définitivement sur le conteneur pour le fermer, par exemple par collage, compression, plaquage ou par tout autre moyen connu de l'homme du métier et assurant la tenue et l'étanchéité requise pour l'utilisation de celui-ci. Il peut aussi être fixé sur le conteneur de manière amovible, toujours en assurant la tenue et l'étanchéité requise pour l'utilisation de celui-ci, afin que le même conteneur ainsi constitué puisse servir à l'immersion successive de dispositifs ou plaquettes selon l'invention, identiques ou différents, et/ou avec différents liquides d'intérêt.

De préférence, le matériau du conteneur, et, le cas échéant, de son capot, est, à l'intérieur de celui-

ci (c'est à dire en regard du substrat et de sa surface active) sensiblement non mouillant vis-à-vis du liquide d'intérêt. En effet, ceci permet d'éviter que des gouttes adhèrent aux surfaces internes du conteneur, après l'extraction du liquide d'intérêt, et tombent sur la surface active et viennent gêner les analyses et réactions sur les zones de travail dans les gouttes capturées par les zones de capture. Des traitements de surface peuvent être nécessaires pour obtenir ce résultat, comme pour la surface active du dispositif de l'invention. Ces traitements peuvent être par exemple ceux précités pour la fabrication de la surface active.

Le conteneur comprend des moyens d'introduction et d'extraction du liquide d'intérêt dudit conteneur, comprenant au moins deux ouvertures. Lorsque le conteneur est fermé, il n'y a pas de limitation dans la position, la forme et la fonction de ces ouvertures autres que celles-ci : elles doivent permettre l'introduction puis l'extraction du liquide d'intérêt du conteneur ; et elles doivent être disposées de telle manière que lorsque le liquide d'intérêt est introduit dans le conteneur, il couvre la ou les zone(s) de capture, et lorsque le liquide d'intérêt est extrait du conteneur, une goutte de liquide d'intérêt reste captive par zone de capture. Le liquide d'intérêt peut entrer puis sortir du conteneur par deux ouvertures différentes. Il peut aussi entrer puis sortir du conteneur par une seule des deux ouvertures, une deuxième ouverture servant à autoriser l'extraction du liquide d'intérêt, soit en laissant passer l'air appelé par l'extraction, soit en injectant par cette deuxième

ouverture un fluide gazeux permettant de pousser le liquide d'intérêt hors du conteneur.

Les ouvertures d'introduction et d'extraction du liquide d'intérêt du conteneur peuvent être
5 disposées sur le capot ou sur les parois du conteneur, par exemple par gravure, emboutissage, moulage, exposition à la lumière pour une résine photosensible, perçage mécanique, etc.

L'introduction du liquide d'intérêt dans le
10 conteneur peut se faire par tout moyen approprié connu de l'homme du métier pour injecter un liquide dans un conteneur, notamment ceux utilisés dans le domaine des laboratoires sur puce et des microsystèmes. Ce moyen d'injection peut être par exemple une seringue, une
15 pipette, une micropipette, une pompe d'injection, etc. L'extraction du liquide d'intérêt peut se faire par tout moyen approprié connu de l'homme du métier pour extraire un liquide d'un conteneur. L'essentiel est que la ou les goutte(s) capturée(s) par la zone de capture
20 ne soient pas emportées lors de l'extraction du liquide d'intérêt.

Par exemple, selon l'invention, le moyen d'extraction du liquide d'intérêt peut être constitué d'une pompe d'injection d'un fluide gazeux par
25 l'ouverture d'entrée de manière à extraire le liquide d'intérêt en le chassant du conteneur par l'ouverture de sortie. Avantageusement, la pompe d'injection du fluide gazeux par l'ouverture d'entrée du conteneur peut alors comprendre un dispositif de saturation du
30 fluide gazeux injecté en vapeur de liquide d'intérêt. Cette saturation permet d'éviter ou de limiter

l'évaporation de la, ou des, goutte(s) capturée(s) par la, ou les, zone(s) de capture.

Par exemple aussi, la pompe d'extraction du liquide d'intérêt du conteneur peut être constituée
5 d'une pompe aspirante disposée de manière à extraire le liquide d'intérêt du conteneur en l'aspirant par l'ouverture de sortie.

Le déroulement du procédé permettant la capture d'une goutte de liquide d'intérêt par zone de capture
10 du dispositif et de la plaquette de l'invention en utilisant la boîte de travail de l'invention peut être schématisé de la manière suivante :

- remplissage total ou partiel du conteneur, ou chambre fluide, par le liquide d'intérêt de
15 manière à couvrir la ou les zone(s) de capture, puis
- extraction du liquide à l'extérieur de la chambre.

Seule(s) la ou les zones de capture retiennent chacune une goutte de liquide d'intérêt, la surface
20 active étant non mouillante.

L'utilisation du dispositif, de la plaquette ou de la boîte de travail de la présente invention peut donc faire intervenir successivement une ou plusieurs
opération(s) qui se déroule(nt) collectivement, avec un
25 ou plusieurs liquides d'intérêt, identiques ou différents, puis des opérations individuelles au niveau de chacune des gouttes formées.

Ainsi, par exemple dans une première opération, dite collective, le dispositif de l'invention permet le
30 passage d'une veine fluide de liquide d'intérêt, par exemple injectée dans la boîte de travail, à une

matrice de gouttes, ou micro-volumes, indépendantes les
unes des autres. Ensuite, des procédés de détection
et/ou de réactions chimiques ou biochimiques connues de
l'homme du métier peuvent être mis en oeuvre
5 individuellement (opération individuelle), en parallèle
ou successivement, dans chacune des gouttes capturées
par les zones de capture.

Dans des procédés à plusieurs étapes utilisant
le dispositif de l'invention, il n'est pas nécessaire
10 que toutes les étapes conduisent à la formation de
gouttes. En effet, rien n'empêche que certaines étapes
soient réalisées en couvrant la totalité des zones de
capture et de travail par un liquide puis en vidant la
boîte de ce liquide de telle manière qu'il ne reste pas
15 de gouttes captives par les zones de capture, par
exemple par injection dans la boîte d'un gaz sous
pression, par agitation énergique, etc.

Sur une même zone de travail du dispositif de
la présente invention, il est possible de capturer
20 successivement différentes gouttes d'un ou de plusieurs
liquides d'intérêt, grâce à la zone de capture qui
l'entoure. Chaque liquide d'intérêt peut contenir un ou
plusieurs réactif(s) nécessaire(s) par exemple à
réaliser une des étapes d'un procédé de chimie ou
25 biochimie, par exemple pour fabriquer la zone de
travail et/ou ou effectuer des analyses. En
conséquence, la succession des différentes gouttes sur
une même zone de travail permet de réaliser les étapes
successives du procédé mis en œuvre. L'ensemble de ces
30 étapes de procédé sera donc avantageusement localisé
sur cette zone de travail grâce à la zone de capture.

Dans des expérimentations liées à la mise en œuvre de la présente invention, les inventeurs ont noté que le dispositif de l'invention résout d'autres problèmes techniques, par rapport aux techniques de l'art antérieur, dans le domaines des laboratoires sur puce, puces biologiques et microsystemes. En particulier, il existe dans l'art antérieur un certain nombre de méthodes de greffage covalent localisé de molécules biologiques pour fonctionnaliser des surfaces de puces biologiques. Cette localisation est en général réalisée par voie chimique, photochimique ou bien électrique. Par voie chimique, l'immobilisation d'un élément biologique (sonde) se fait par dépôt localisé (« spotting ») ou synthèse in situ ce qui est contraignant en termes de temps. Par voie photochimique, il est possible de réaliser des synthèses d'oligonucléotides à l'aide de groupements photolabiles [4] : ici encore, des limitations en termes de temps de synthèse et de volumes de réactifs coûteux sont souvent rencontrées. De plus, des réactions radicalaires non sélectives peuvent avoir lieu. Par voie électrique, la synthèse d'oligonucléotides sur support solide avec groupement électro-labile rencontre les mêmes limitations. Par voie électrochimique [3], par copolymérisation de pyrrole et de pyrrole porteur d'une espèce biologique sur une électrode métallique. Cette dernière technique présente l'inconvénient de requérir des volumes importants de réactifs coûteux (pyrrole porteur de l'espèce biologique).

Le dispositif de la présente invention permet de résoudre ces nombreux problèmes de l'art antérieur.

En effet, il permet de fonctionnaliser rapidement et précisément des surfaces de puces biologiques, qui sont devenues dans la présente invention les zones de travail, grâce à une localisation rapide et précise du
5 liquide d'intérêt sur la ou les zone(s) de travail, et un contrôle précis des densités de sondes immobilisées. En outre, par rapport aux procédés de l'art antérieur, les volumes de réactifs utilisés sont nettement moins importants du fait de la localisation précise de la
10 réaction dans le volume des gouttes de réactifs capturées par les zones de capture. En outre, les expérimentations des inventeurs ont montré que le dispositif de la présente invention permet de travailler en micro-volumes indépendants les uns des
15 autres, sans contamination croisée entre les plots de détection, ce qui augmente considérablement la précision et la reproductibilité des analyses.

Ainsi, la présente invention permet entre autre une mesure électrochimique ou optique en milieu
20 confiné, dans la goutte capturée par la zone de capture, mais également une fonctionnalisation localisée sur la zone de travail par voie électrochimique ou chimique avec des réactifs coûteux (volume des réactifs restreints à la vraie zone utile
25 formée par la zone de travail entourée par sa zone de capture selon l'invention).

Cette invention trouve actuellement son plus grand intérêt dans le cas d'un dispositif fermé, par exemple dans les applications laboratoire sur puce et
30 microsystèmes. Cependant, il est à noter que cette invention peut également être appliquée dans le cas

d'une dispense de liquide par un robot afin de maintenir parfaitement localisé un liquide d'intérêt.

Selon l'invention, des détections de différentes molécules susceptibles d'être présentes
5 dans le liquide d'intérêt peuvent être réalisées en parallèle, simultanément ou successivement, dans différentes gouttes de liquide d'intérêt captives sur ladite surface active dans la boîte.

Selon l'invention, le, au moins un, analyte à
10 détecter peut être choisi par exemple parmi les molécules biologique ou chimique. Les molécules biologiques peuvent être choisies par exemple dans le groupe constitué par une enzyme, un substrat d'enzyme, un oligonucléotide, un oligonucléoside, une protéine,
15 un récepteur membranaire d'une cellule eucaryote ou procaryote, un virus, un anticorps, un antigène, une hormone, un métabolite d'un organisme vivant, une toxine d'un organisme vivant, un nucléotide, un nucléoside, un ADN complémentaire. La molécule chimique
20 peut être toute molécule qui doit être analysée qualitativement et/ou quantitativement.

D'autres caractéristiques et avantages apparaîtront encore à l'homme du métier à la lecture
25 des exemples qui suivent donnés à titre illustratif et non limitatif en référence aux figures annexées.

Brève description des figures

- Les figures 1 et 2 représentent
30 schématiquement différents dispositifs conformes à la présente invention.

- La figure 3 représente schématiquement différents modes de réalisation du dispositif de la présente invention.

5 - La figure 4 représente schématiquement un dispositif de l'invention dans lequel la zone de travail est un microsystème électrochimique.

- Les figures 5a) et 5b) sont deux photographie d'un dispositif selon l'invention, dans lequel la zone de travail est une microcellule
10 électrochimique : la figure 5a) avant capture d'une goutte de liquide d'intérêt, et la figure 5b) après capture d'une goutte de liquide d'intérêt.

- La figure 6 est un graphique montrant la détection, au niveau d'une zone de travail, d'un
15 produit d'une réaction enzymatique au sein d'une goutte capturée par la zone de capture correspondant à cette zone de travail dans un dispositif selon l'invention.

- La figure 7 représente des coupes transversales d'un mode de réalisation possible d'une
20 boîte de travail selon l'invention.

- La figure 8 représente des coupes transversales d'une représentation schématique de différents modes de réalisations possibles d'une boîte de travail selon l'invention, en particulier elle
25 représente des exemples de dispositions des ouvertures d'entrée et de sortie du liquide d'intérêt sur différentes boîtes de travail conformes à la présente invention.

- La figure 9 est une représentation
30 schématique d'une plaquette selon l'invention

comportant plusieurs dispositifs selon l'invention disposés en matrice.

EXEMPLES

5

Exemple 1 : fabrication de surfaces actives non mouillantes selon l'invention

Un substrat de silicium (Si) avec une couche supérieure d'oxyde de silicium (SiO₂) de 300 nm est
10 traité avec un silane hydrophobe (1H, 1H, 2H, 2H perfluorodécyl-trichlorosilane) pour rendre la surface hydrophobe.

Le protocole est le suivant : après traitement dans un mélange soude/eau/éthanol à 3,5 M pendant 2
15 heures à température ambiante pour générer les sites silanols, le substrat est placé pendant 10 minutes à température ambiante dans un mélange toluène anhydre/silane hydrophobe à 9 mM en concentration de silane. Il est ensuite lavé avec du toluène puis de
20 l'acétone, puis de l'éthanol et finalement nettoyé aux ultrasons pendant 5 minutes dans l'éthanol. Le substrat est ensuite placé dans une étuve pendant 1 heure à 110°C. L'angle de contact mesuré avec l'eau est de 110°.

25

Exemple 2 : fabrication d'une zone de capture constituée d'un matériau support disposé sur la surface active

Sur substrat de Si avec une couche de SiO₂ de
30 300 nm, réalisation d'étapes standard pour l'homme du métier de la microélectronique :

- dépôt de 300 nm de platine (Pt) par pulvérisation ;
- photolithographie dans une résine photosensible avec ouverture d'un motif circulaire relié à
5 une bande d'arrivée de courants ;
- dans un réacteur à plasma, gravure ionique complète du Pt dans les zones sans résine ;
- retrait de la résine dans un bain d'acide nitrique ;
- 10 - dans un réacteur à plasma, dépôt chimique en phase vapeur de 500nm de SiO₂ ;
- photolithographie dans une résine photosensible avec ouverture du motif circulaire ;
- dans un réacteur à plasma, gravure ionique
15 complète de 500nm de SiO₂ dans les zones sans résine ; et
- retrait de la résine dans un bain d'acide nitrique.

20 La figure 3a est une représentation schématique d'une zone de capture circulaire constituée d'un matériau support et entourant une zone de travail.

**Exemple 3 : fabrication d'une zone de capture
25 constituée de silicium noir**

Sur un substrat de Si (toutes ces étapes sont très bien connues de l'homme du métier de la microélectronique) :

- photolithographie dans une résine photosensible
30 avec ouverture d'un motif en couronne ;

- dans un réacteur à plasma, gravure réactive ionique d'environ 3 μ m de silicium suivant le protocole décrit dans le document [11] pour former du silicium noir ;
- 5 - nettoyage de la surface en fin de gravure par passage dans un réacteur à plasma Plassys MDS 150 (société Plassis, France) avec les conditions suivantes : puissance 500W, temps de réaction 4 minutes, pression 21,33 Pa
- 10 (160 mTorr), débit d'oxygène 25cm³/min., température ambiante ; et
- retrait de la résine dans un bain d'acide nitrique.

15 Le silicium noir formé sur ces zones déterminées est fortement hydrophile, tandis que le silicium est sensiblement non mouillant vis-à-vis des liquides d'intérêt aqueux (échantillons).

 Les figures 1 et 2 montrent schématiquement

20 différentes zones de captures formées autour de leur zone(s) de travail. La structuration fine a été réalisée de manière à créer une bande de silicium noir, ouverte ou fermée, qui constitue la zone de capture (Zc), autour d'une zone prévue pour former la zone de

25 travail (Zt). Sur la figure 2, une zone de capture est aménagée autour de deux (à droite) ou quatre (à gauche) zones de travail.

 La zone gravée ne nécessite pas d'autre modification chimique. Ce dispositif de l'invention est

30 destiné à être utilisés avec des liquides d'intérêt aqueux

Exemple 4 : fabrication d'une zone de capture sous forme d'une électrode de capture par mouillage

4.1 ZONE DE CAPTURE SOUS FORME D'UNE ELECTRODE DE CAPTURE :

Sur un substrat de Si avec une couche de SiO₂ de 300 nm, les étapes suivantes sont réalisées :

- α) Les mêmes étapes que dans l'exemple 2 sont réalisées pour disposer une électrode (matériau support) sur la surface active.
- β) Réalisation de la surface active non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt sur l'ensemble du substrat pour le rendre hydrophobe comme dans l'exemple 1. L'électrode est ensuite nettoyée par voie chimique avec une solution de soude/eau/éthanol. Pour ce faire, une goutte d'un mélange soude/eau/éthanol à 3,5 M est déposée sur les électrodes pendant 2 heures à température ambiante. Les électrodes sont ensuite lavées à l'eau puis séchées.
- γ) Dans des expérimentations supplémentaires, une barrière hydrophile a été réalisée sur l'électrode par électropolymérisation en conditions potentiostatiques d'un pyrrole porteur de fonctions alcools (fonctions mouillantes vis-à-vis d'un liquide d'intérêt aqueux) en position 3. Ce polypyrrole est généré à partir d'une solution de pyrrole-3-éthanol 100 mM et de perchlorate de lithium (LiClO₄) 0,5 M. Un potentiel de 1 V vs Ag/AgCl/Cl⁻ est appliqué pendant 5 secondes.

L'angle de contact mesuré avec l'eau sur l'électrode est de 53°.

La figure 3a est une représentation schématique d'un dispositif selon l'invention obtenu en utilisant
5 le protocole de cet exemple. Sur cette figure, la zone de capture (Zc), entourant la zone de travail (Zt), est formée par une électrode recouverte d'un polypyrrole porteur de fonctions mouillantes (fonctions alcools).

10 **4.2 ZONE DE CAPTURE SOUS FORME D'UNE BANDE MOUILLANTE :**

Sur un substrat de Si avec une couche de SiO₂ de 300nm, les étapes suivantes ont été réalisées :

- 15 α) Réalisation de la surface active non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt sur l'ensemble du substrat pour le rendre hydrophobe comme dans l'exemple 1.
- 20 β) Photolithographie dans une résine photosensible de type négative (référence NFR-015 du fournisseur Shipley) avec une ouverture d'un motif en couronne, pour former la zone de capture (ou bande mouillante) ;
- 25 γ) Destruction du silane hydrophobe dans les motifs ouverts de la résine photosensible par passage dans un réacteur à plasma Plassys MDS 150 (société Plassys, France) avec les conditions suivantes : puissance 500W, temps de réaction 4 minutes, pression 21,33 Pa (160 mTorrs), débit d'oxygène 25cm³/min.,
30 température ambiante ; et

5 δ) Réalisation de la zone de capture par
 silanisation avec un silane porteur de
 fonctions amines (fonctions mouillantes pour le
 liquide d'intérêt aqueux). Le substrat est
 placé dans une solution de μ -aminopropyl
 triéthoxysilane à 10% en volume dans l'éthanol.
 Après une nuit à température ambiante, le
 substrat est lavé à l'éthanol et enfin laissé
 pendant trois heures dans une étuve à 110°C.

10

**Exemple 5 : Fabrication d'une zone de travail
fonctionnalisée par une sonde selon l'invention**

15 Dans cet exemple, une puce comprenant quatre
 électrodes est fabriquée et utilisée. Sur un substrat
 de Si avec une couche de SiO_2 de 300 nm, réalisation
 d'étapes standard pour l'homme du métier de la
 microélectronique :

- 20 - dépôt de 300 nm de platine (Pt) par
 pulvérisation ;
- photolithographie dans une résine photosensible
 avec ouverture des motifs de la microcellule,
 de l'électrode de capture et des bandes
 d'arrivée de courants ;
- 25 - dans un réacteur à plasma, gravure ionique
 complète du Pt dans les zones sans résine ;
- retrait de la résine dans un bain d'acide
 nitrique ;
- dans un réacteur à plasma, dépôt chimique en
 phase vapeur de 500nm SiO_2 ;

- photolithographie dans une résine photosensible avec ouverture des motifs des électrodes de la microcellule et de l'électrode de capture ;
- dans un réacteur à plasma, gravure ionique complète de 500nm de SiO₂ dans les zones sans résine ; et
- retrait de la résine dans un bain d'acide nitrique.

10 L'électrode de travail (We), la contre-électrode (CE) et l'électrode annexe utilisée pour former la zone de capture (Zc) sont en platine (dépôt 5000 Å environ) (voir fig. 4).

15 Une électrode de référence Ag/AgCl/Cl⁻ (Rf) est également présente. Cette électrode est obtenue par dépôt d'argent sur le platine avec le protocole suivant :

- préparation de 10 ml de solution contenant AgNO₃ 0,2 M, KI 2 M, Na₂S₂O₃ 0,5 mM ;
- 20 - un potentiel de -0,65 V vs ECS (électrode au calomel saturé) est imposé pendant 90 secondes (suivi par chronoampérométrie) sur l'électrode de référence. Un dépôt gris/blanc est obtenu. La zone de travail est ensuite rincée à l'eau ;
- 25 et
- la zone de travail avec l'électrode modifiée précédemment est plongée dans une solution de HCl 0,1 M et on impose un potentiel de 0,5 V vs ECS pendant 30 secondes pour chlorer le dépôt
- 30 d'argent. Le substrat est ensuite rincé à l'eau.

L'ensemble des zones de travail a été silanisé avec un silane hydrophobe suivant le protocole décrit dans l'exemple 1.

La barrière hydrophile est réalisée sur
5 l'électrode de capture selon le protocole décrit dans l'exemple 4.1-(γ).

La contre-électrode (CE) est ensuite fonctionnalisée avec un copolymère conducteur pyrrole/pyrrole fonctionnalisé en position 1 par la
10 fonction biologique (ici un oligonucléotide sonde) [5]. L'électropolymérisation est localisée sur la contre-électrode de la zone de travail.

Pour tester cette zone de travail, l'oligonucléotide sonde est hybridé avec un
15 oligonucléotide cible (100 pM) porteur d'un marqueur enzymatique (HRP "Horse Radish Peroxidase") dans un tampon (NaCl 1 M/Tris 10 mM/EDTA 1 mM/Triton X100 0,05%). Après des lavages dans le même tampon mais sans triton, la solution de révélation (OPD + H₂O₂ + tampon
20 phosphate-citrate 50 mM) est introduite sur le dispositif de la présente invention puis aspirée. Une fraction de liquide est bien laissée de manière localisée sur la zone de travail comme le montrent les photographies de la figure 5 :

25 - à gauche, avant que le dispositif ne soit recouvert de la solution de révélation, on distingue le dispositif de la présente invention sans la goutte ; et
- à droite, après que la solution de révélation ait été aspirée, on distingue le dispositif
30 de la présente invention ayant capturé grâce à sa zone

de capture (bande hydrophile) une goutte de la solution de révélation.

Après 5 minutes de révélation, le produit enzymatique est détecté par voltampérométrie pulsée différentielle sur l'électrode de mesure (WE). Les résultats de cette détection sont représentés par le graphique de la figure 6 annexée.

La figure 4 est une représentation schématique d'une microcellule électrochimique d'un dispositif selon l'invention obtenu en utilisant le protocole de cet exemple. Sur cette figure, la zone de travail est constituée de l'électrode de mesure ou électrode de travail (WE), du polymère conducteur porteur de l'oligonucléotide (Po) déposé sur la contre-électrode (CE) et de la zone de capture (Zc) formée par l'électrode la plus externe sur laquelle le polymère porteur des fonctions alcools a été déposé (Pm). L'ensemble est réalisé sur la surface active (Sa) non mouillante.

20

Exemple 6 : Fonctionnalisation localisée de zones de travail de puces selon l'invention avec un réactif coûteux

Dans cet exemple, on utilise un système à quatre électrodes dont la surface a été rendue hydrophobe comme dans l'exemple 5. La barrière hydrophile et le greffage de la molécule biologique sont réalisés avec le protocole suivant :

A) réalisation de la barrière hydrophile qui constitue la zone de capture : la barrière

30

hydrophile est réalisée comme dans l'exemple 4.1.

5 B) introduction sur le composant de la solution électrolytique contenant le pyrrole, le pyrrole fonctionnalisé par un oligonucléotide et l'électrolyte support LiClO_4 0,1 M. La solution est aspirée laissant ainsi une goutte de la solution électrolytique bien localisée sur la zone de travail (microcellule électrochimique) donnant le même résultat que celui qui est montré sur la photographie de droite de la figure 5. L'électropolymérisation est alors réalisée sur la contre-électrode en conditions potentiostatiques (1 V vs $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$) pendant 15 2 secondes. Le polypyrrole porteur de l'oligonucléotide est ainsi déposé sur la zone de travail exclusivement.

20 Le dispositif de l'invention permet donc bien d'économiser les réactifs notamment lors d'une fonctionnalisation d'une grande surface comprenant plusieurs dispositifs électrochimiques indépendants répartis sur cette surface, et donc aussi pour confiner le réactif sur la zone d'électrodes d'une puce complète 25 selon l'invention.

Il est également possible de réaliser ainsi un système dans lequel la bande mouillante (zone de capture) entoure un ensemble de microcellules électrochimiques, c'est-à-dire plusieurs zones de 30 travail, par exemple comme sur la figure 2.

Exemple 7 : Fabrication d'une boîte selon l'invention et fonctionnement de cette boîte

7.1 Fabrication de la boîte

Un capot creux en polydiméthylsiloxane (PDMS)
5 est fabriqué par moulage sur un moule en verre avec un motif carré en surépaisseur de 1 mm.

Sur un dispositif de la présente invention plan
comme ceux obtenus dans les exemples précédents, ce
capot creux est fixé de manière hermétique par collage
10 avec de la colle réticulant par insolation aux rayons ultraviolets (VITRALIT 6181). Les connexions pour les entrées et sorties des fluides sont réalisées par perçage du capot avec des aiguilles de faible diamètre. L'aiguille d'entrée est reliée à des tubes de transport
15 de fluide et à une seringue pleine du liquide d'intérêt. L'ensemble final est testé pour détecter d'éventuelles fuites, sachant que le liquide doit passer uniquement par les connexions prévues à cet effet.

20 La figure 7 est une représentation schématique de la boîte telle obtenue dans cet exemple. D'autres dispositions des connexions d'entrée et de sortie peuvent facilement être réalisées, et la figure 8 reprend des représentations schématiques des boîtes qui
25 peuvent être obtenues suivant le protocole décrit dans cet exemple.

Sur cette figure 8, B1, B2 et B3 représentent
trois types de boîtes selon l'invention avec des
ouvertures d'entrée (o) et de sortie (s) placées
30 différemment. Sb, Sa, Zc, Zt ont la même signification que sur les figures précitées. les différents éléments

qui la constituent la boîte de l'invention sont représentés de la même manière sur les trois schémas.

La figure 9 est une représentation schématique vue du dessus d'une plaquette P selon l'invention qui est utilisée pour fabriquer une boîte selon l'invention. Cette plaquette comporte 81 zones de capture et zone de travail correspondantes agencées sur une surface active non mouillante conformément à la présente invention.

10

7.2 Fonctionnement de la boîte et résultats

Le fonctionnement des boîtes précitées est testé. La figure 7 représente le fonctionnement de la boîte B1 de la figure 8. Le liquide d'intérêt E est injecté dans la boîte (7a) par une des ouvertures (o) jusqu'à remplissage (7b), puis extrait par l'autre ouverture (s). Le moyen d'injection utilisé est une seringue, et le moyen d'extraction utilisé est une seringue.

Le remplissage de la boîte n'est pas obligatoire, l'essentiel est que les différentes zones de capture soient couvertes par le liquide d'intérêt.

Cet exemple montre qu'une matrice de gouttes (g) bien localisées sur les différentes zones de capture est obtenue grâce à ce dispositif conforme à la présente invention.

25

Liste des références

- [1] WO 02/16023: Protogene Laboratories Inc.
- [2] US 6,040,193: Affymetrix Inc.
- [3] WO 99/03684 : Eapen Saji et col.
- 5 [4] Azek et al., *Analytical Biochemistry*, 2000, **284**, 107-113.
- [5] WO 00/36145 : Commissariat à l'Energie Atomique.
- [6] WO 02/090573 : Infineon.
- 10 [7] Junghoon Lee et al., "Electrowetting and Electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling", *Sensor and Actuators A* 95 (2002), 259-268.
- [8] J. Cooper et al., "Micromachining Sensor for Electrochemical Measurement in Subnanoliter Volumes", *Anal. Chem.* **1997**, 69, 253-258.
- 15 [9] Mengsu Yang et al., "Covalent Immobilisation of Oligonucleotides on Modified Glass/Silicon Surfaces for Solid-Phase DNA Hybridization and Amplification", *Chemistry Letters* **1998**, 257-258.
- 20 [10] Mila Boncheva et al., "Design of Oligonucleotide Arrays at Interfaces", *Langmuir* **1999**, 15, 4317-4320.
- [11] H. Jansen et al., "The black silicon method : a universal method for determining the parameter setting of a fluorine-based reactive ion etcher in deep silicon trench etching with profile control", *J. Micromech. Microeng.* 5 (1995), 115-120.
- 25 [12] FR-A-2 818 662.
- [13] EP-B-561 722.

REVENDICATIONS

1. Dispositif de travail comprenant :
 - un substrat comportant une surface active
 - 5 (Sa) sensiblement non mouillante vis-à-vis d'un liquide d'intérêt,
 - au moins une zone de capture (Zc) localisée d'une goutte dudit liquide d'intérêt formée sur ladite surface active,
 - 10 - au moins une zone de travail (Zt) arrangée avec la zone de capture pour que ladite zone de capture entoure la zone de travail de manière continue ou discontinue, de telle manière que la zone de travail soit recouverte au moins partiellement par la goutte du
 - 15 liquide d'intérêt lorsque celle-ci est capturée par ladite zone de capture,
 - des moyens d'approvisionnement en liquide d'intérêt permettant de laisser une goutte dudit liquide d'intérêt sur ladite zone de capture.
 - 20
2. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel au moins une zone de capture a une forme ouverte ou fermée choisie parmi une forme annulaire, en étoile, en rectangle, en carré, en triangle, en ellipse, ou en
- 25 polygone ayant de 4 à 20 côtés, et entoure la, au moins une, zone de travail.
3. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel une zone de capture d'une goutte de liquide
- 30 d'intérêt entoure plusieurs zones de travail.

4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la zone de capture est une zone de capture chimique, électrique ou physique d'une goutte de liquide d'intérêt.

5

5. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel la zone de capture est un creux de, ou une saillie sur, la surface active permettant de capturer la goutte par des forces capillaires.

10

6. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel la, au moins une, zone de capture est une électrode de capture par mouillage.

15

7. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel la, au moins une, zone de capture est constituée de silicium noir.

8. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel la, au moins une, zone de capture est une électrode de capture par électro-mouillage.

20

9. Dispositif selon la revendication 6, dans lequel l'électrode de capture par mouillage est constituée d'un matériau choisi dans le groupe constitué des métaux nobles, des alliages de métaux nobles, de carbone, de graphite, d'ITO, ledit matériau étant rendu mouillant par électrodéposition sur celui-ci d'un polymère conducteur d'électricité sur lequel est fixée une fonction chimique mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt.

25

30

10. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel la zone de capture est constituée d'un matériau rendu mouillant par greffage sur celui-ci d'une
5 fonction chimique mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt.

11. Dispositif selon la revendication 10, dans lequel le matériau est choisi dans le groupe constitué
10 du silicium, de l'oxyde de silicium, du verre, du nitrure de silicium, des polymères organiques ; et d'un métal ou d'un alliage métallique.

12. Dispositif selon la revendication 11, dans lequel le greffage sur le matériau est réalisé par
15 silanisation avec un silane porteur de la fonction chimique mouillante.

13. Dispositif selon la revendication 6, dans lequel l'électrode de capture par mouillage est une
20 électrode en or rendue mouillante par physisorption d'un thiol sur lequel est fixée une fonction chimique mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt.

14. Dispositif selon l'une quelconque des
25 revendications 9 à 13, dans lequel, le liquide d'intérêt étant aqueux, la fonction chimique mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt est choisie dans le groupe constitué d'une fonction alcool, alcoolate,
30 acide carboxylique, carboxylate, acide sulfonique, sulfonate, oxyamine, hydrazine, amine, ammonium.

15. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel, le liquide d'intérêt étant aqueux, la, au moins une, zone de capture est une zone hydrophile et la
5 surface active sensiblement non mouillante est hydrophobe.

16. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la zone de
10 capture et la, ou les, zone(s) de travail arrangée(s) avec elle peuvent être placées dans un creux ou sur une saillie par rapport à la surface active.

17. Dispositif selon l'une quelconque des
15 revendications précédentes, dans lequel la, au moins une, zone de travail est une zone d'interaction électrique et/ou chimique avec ladite goutte de liquide d'intérêt capturée.

20 18. Dispositif selon la revendication 17, dans lequel la, au moins une, zone de travail est une microcellule électrochimique.

19. Dispositif selon l'une quelconque des
25 revendications 1 à 18, dans lequel la, au moins une, zone de travail est une zone de détection d'au moins une espèce chimique ou biologique susceptible d'être présente dans la goutte de liquide d'intérêt lorsqu'elle est capturée.

30

20. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, dans lequel la, au moins une, zone de travail est une zone fonctionnalisée par une sonde destinée à interagir avec une cible susceptible
5 d'être présente dans la goutte de liquide d'intérêt lorsqu'elle est capturée.

21. Dispositif selon la revendication 18 lorsqu'elle dépend de l'une quelconque des
10 revendications 6, 9 à 14, dans lequel l'électrode de capture d'une goutte de liquide d'intérêt par mouillage sert également d'électrode pour le fonctionnement de la microcellule électrochimique de la zone de travail.

15 22. Dispositif selon la revendication 17 ou 18 lorsqu'elle dépend de la revendication 9, dans lequel l'électrode de capture d'une goutte de liquide d'intérêt par mouillage sert également d'électrode pour le fonctionnement de la microcellule électrochimique de
20 la zone de travail, et dans lequel ladite électrode est fonctionnalisée par une sonde destinée à interagir avec une cible susceptible d'être présente dans la goutte de liquide d'intérêt.

25 23. Dispositif selon la revendication 22, dans lequel la sonde est fixée sur le polymère conducteur d'électricité porteur d'une fonction mouillante.

30 24. Dispositif selon la revendication 9, 22 ou 23, dans lequel le polymère conducteur d'électricité est choisi dans le groupe constitué du polypyrrole, de

la polyaniline, du polyazulène, d'un polythiophène, d'un polyindole, d'un polyfurane, d'un polyfluorène.

25. Dispositif selon l'une quelconque des
5 revendications 20, 22 à 24, dans lequel la sonde est choisie dans le groupe constitué par une enzyme, un substrat d'enzyme, un oligonucléotide, un oligonucléoside, une protéine, un récepteur membranaire
10 antigène, une hormone, un métabolite d'un organisme vivant, une toxine d'un organisme vivant, un polynucléotide, un polynucléoside, un ADN complémentaire.

15 26. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans lequel la, au moins une, zone de travail est un capteur choisi dans le groupe constitué des capteurs optiques, électriques, magnétiques, électrostatiques, mécaniques, thermiques
20 et chimiques.

27. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans lequel la, au moins une, zone de travail est un actionneur choisi dans le groupe
25 constitué des actionneurs optiques, électriques, magnétiques, électrostatiques, mécaniques, thermiques et chimiques.

28. Dispositif selon la revendication 1, dans
30 lequel la, au moins une, zone de travail est une zone

sensiblement non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt.

29. Dispositif selon l'une quelconque des
5 revendications précédentes, dans lequel la surface active est une surface constituée d'un matériau choisi dans le groupe constitué du silicium ; de l'oxyde de silicium ; du verre ; du nitrure de silicium ; d'un polymère organique ; d'un métal ou d'un alliage
10 métallique.

30. Plaquette de travail comprenant plusieurs dispositifs de travail identiques ou différents selon l'une quelconque des revendications 1 à 29.
15

31. Plaquette de travail selon la revendication 30, dans laquelle les dispositifs de travail forment une matrice.

32. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 29, ou plaquette selon la revendication 30 ou 31, dans lequel les moyens permettant de laisser une goutte de liquide d'intérêt sur ladite zone de capture localisée est un distributeur
20 d'une goutte de liquide d'intérêt par zone de capture.
25

33. Boîte de travail comprenant :
- un conteneur comprenant des moyens pour l'introduction d'un liquide d'intérêt dans le conteneur
30 et d'extraction de liquide d'intérêt du conteneur,

- un dispositif de travail selon la revendication 1, ou une plaquette selon la revendication 30 ou 31, placé(e) dans ledit conteneur, les moyens d'introduction et d'extraction du
5 liquide d'intérêt du conteneur étant disposés de telle manière que lorsque le liquide d'intérêt est introduit dans le conteneur, il couvre la, au moins une, zone(s) de capture, puis lorsque le liquide d'intérêt est extrait du conteneur, une goutte de liquide d'intérêt
10 reste captive par ladite zone de capture.

34. Boîte de travail selon la revendication 33, dans lequel les moyens d'extraction du liquide d'intérêt du conteneur sont constitués d'une pompe
15 d'injection d'un fluide gazeux par une ouverture d'entrée de manière à extraire le liquide d'intérêt en le chassant du conteneur par une ouverture de sortie.

35. Boîte de travail selon la revendication 34, dans lequel la pompe d'injection du fluide gazeux par
20 l'ouverture d'entrée du conteneur comprend un dispositif de saturation du fluide gazeux injecté en vapeur du liquide d'intérêt.

36. Boîte de travail selon la revendication 33, dans lequel les moyens d'extraction de liquide d'intérêt du conteneur sont constitués d'une pompe aspirante disposée de manière à extraire le liquide
25 d'intérêt du conteneur en l'aspirant.

37. Système comprenant un ou plusieurs dispositif(s) de travail selon l'une quelconque des revendications 1 à 29, ou une plaquette selon la revendication 30 ou 31.

5

38. Système comprenant une boîte de travail selon l'une quelconque des revendications 33 à 36.

39. Puce biologique comprenant un dispositif de travail selon l'une quelconque des revendications 1 à 29, ou une plaquette selon la revendication 30 ou 31.

40. Puce biologique selon la revendication 39, ladite puce étant choisie dans le groupe constitué des puces à acide nucléique, à anticorps, à antigènes, à protéine et à cellules.

41. Boîte comprenant une puce biologique selon la revendication 39 ou 40.

20

42. Procédé de fabrication d'un dispositif selon la revendication 1, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- fournir un substrat comportant une surface choisie pour devenir la surface active,
- structurer la surface choisie du substrat afin de former sur celle-ci une zone de travail,
- appliquer un traitement sur la surface choisie afin de la rendre sensiblement non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt auquel le dispositif est destiné, et

30

- structurer la surface choisie afin de former une zone de capture d'une goutte de liquide d'intérêt,

- les étapes de structuration de la surface pour
- 5 former une zone de travail et de structuration de la surface pour former la zone de capture étant réalisées afin que la zone de travail soit arrangée avec la zone de capture pour que la zone de capture entoure la zone de travail de manière continue ou discontinue de telle
- 10 manière que lorsque la zone de capture capture une goutte de liquide d'intérêt la zone de travail soit recouverte au moins partiellement par ladite goutte.

1 / 4

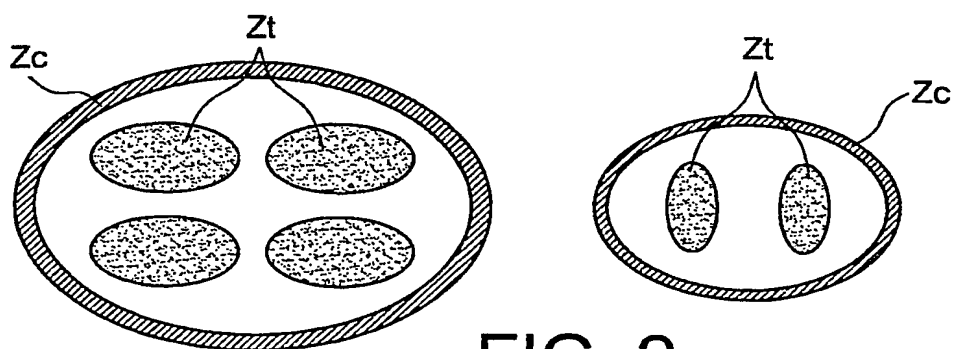
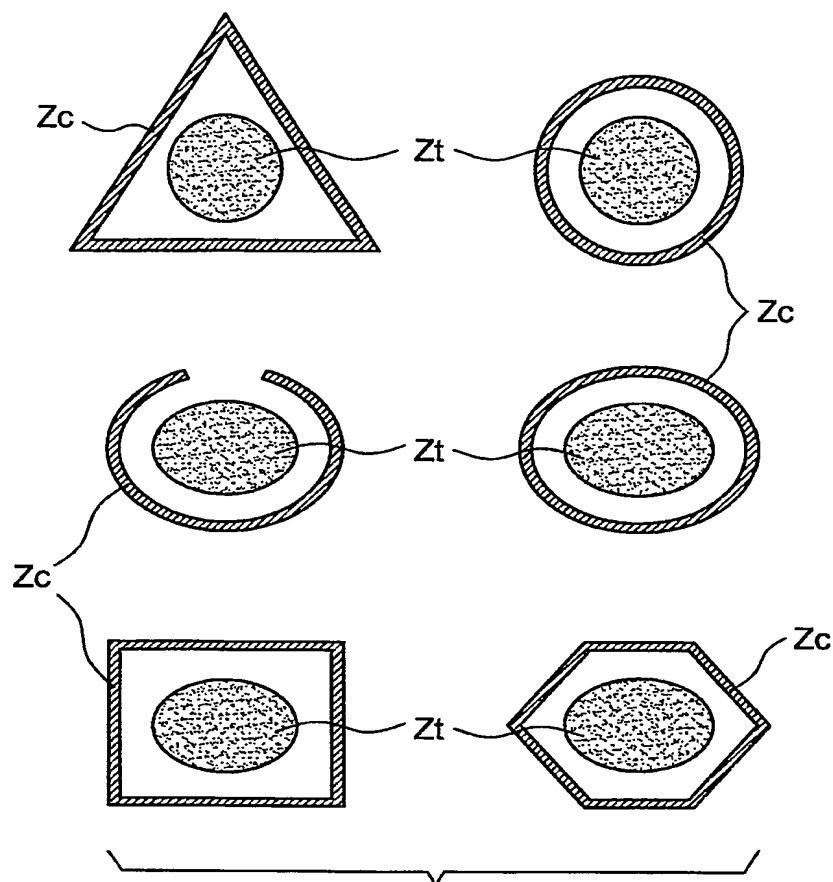


FIG. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 4

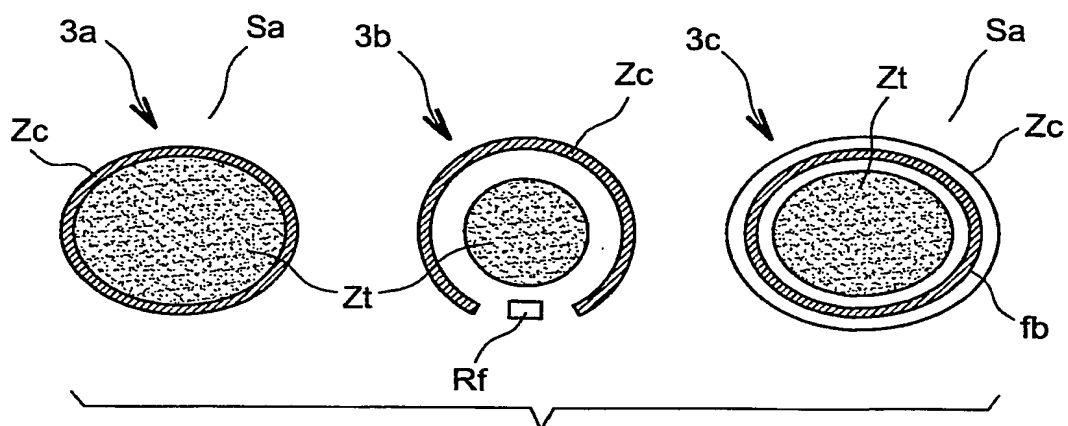


FIG. 3

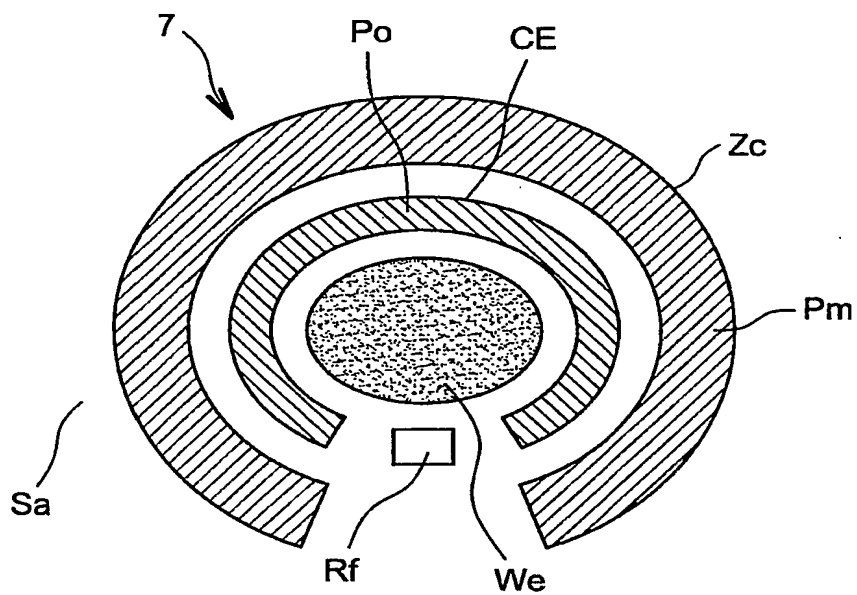


FIG. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 4

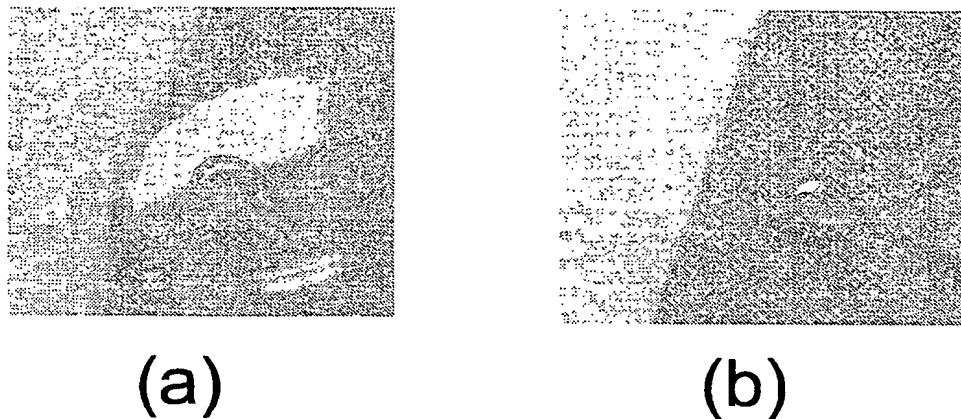


FIG. 5

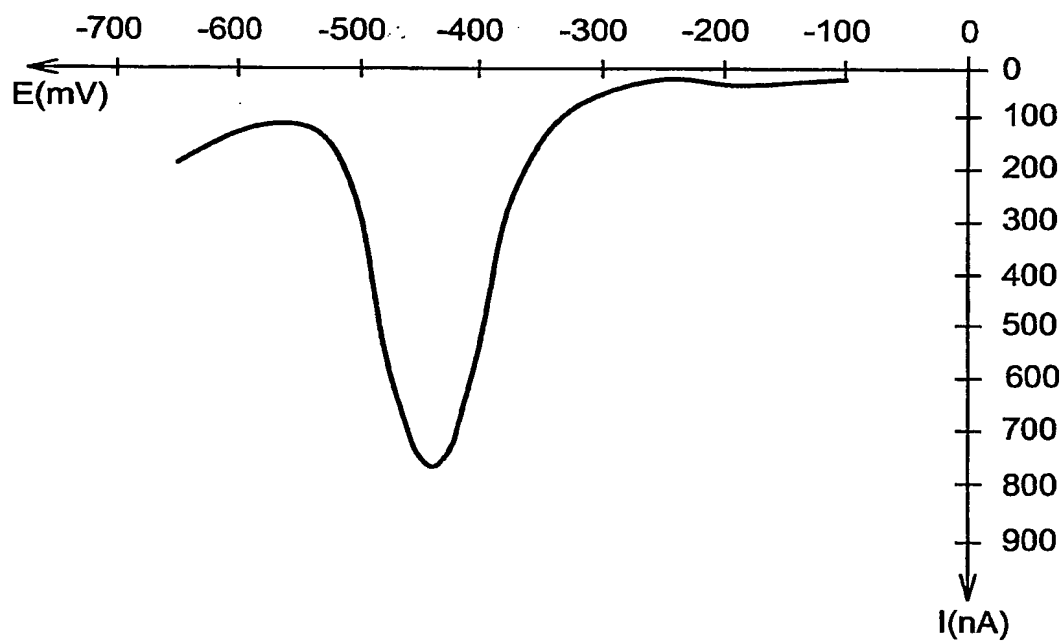


FIG. 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 4

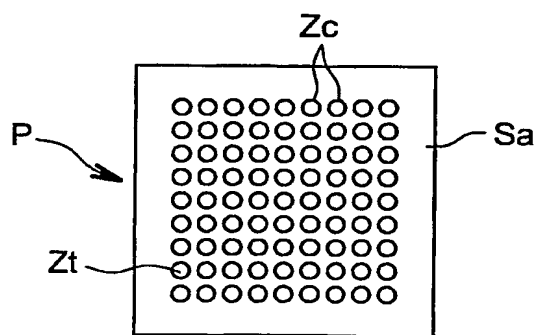
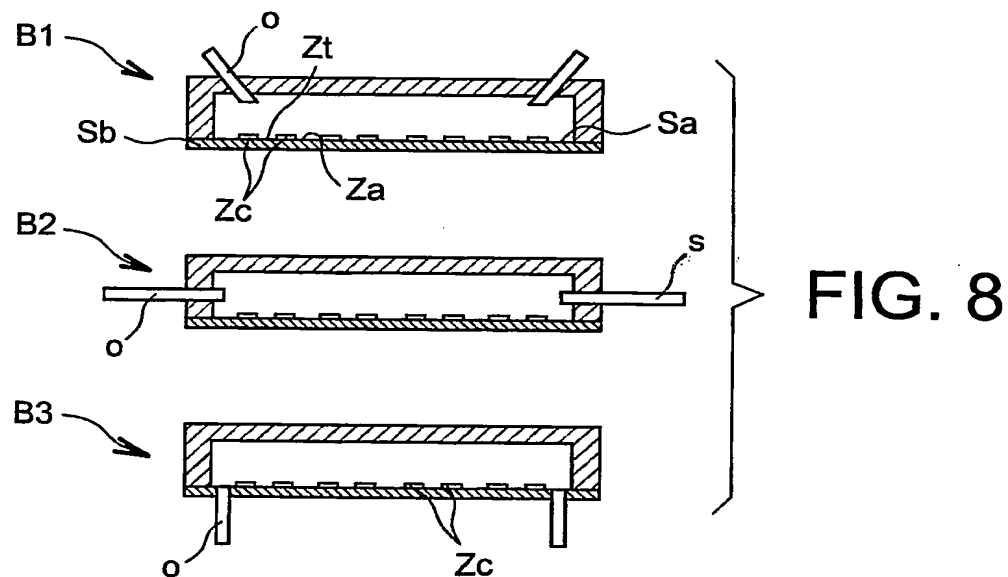
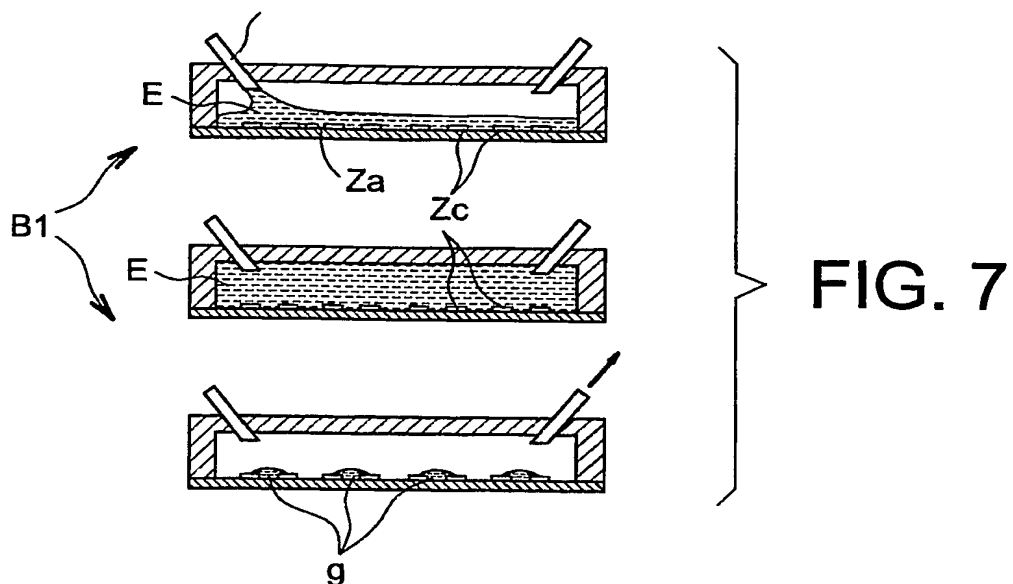


FIG. 9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/050526

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01L3/00 B01J19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01L B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/059518 A (ALDERMAN JOHN CHARLES ; O'CONNOR ROSEMARY (IE); PAPKOVSKY DMITRI (IE);) 24 July 2003 (2003-07-24) the whole document	1-42
X	US 6 565 813 B1 (GARYANTES TINA) 20 May 2003 (2003-05-20) column 3, line 13 - column 7, line 37	1-42
X	US 6 210 894 B1 (BRENNAN THOMAS M) 3 April 2001 (2001-04-03) column 3, line 66 - column 9, line 29	1-42
A	US 6 143 496 A (KALININA OLGA V ET AL) 7 November 2000 (2000-11-07) the whole document	1-42
	----- -/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 February 2005

Date of mailing of the international search report

18/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Skowronski, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/050526

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/41992 A (MUND KONRAD ; HINTSCHE RAINER (DE); SIEMENS AG (DE); STANZEL MANFRED () 30 May 2002 (2002-05-30) the whole document -----	1-42
A	WO 01/87458 A (AHN CHONG H ; CHO HYOUNG J (US); CHOI JIN WOO (US); UNIV CINCINNATI (U) 22 November 2001 (2001-11-22) the whole document -----	1-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/050526

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 03059518	A	24-07-2003	AU	2003202120 A1	30-07-2003
			EP	1465730 A2	13-10-2004
			WO	03059518 A1	24-07-2003
US 6565813	B1	20-05-2003	US	2004018615 A1	29-01-2004
			CA	2318881 A1	12-08-1999
			EP	1060022 A1	20-12-2000
			JP	2002502955 T	29-01-2002
			WO	9939829 A1	12-08-1999
US 6210894	B1	03-04-2001	US	5985551 A	16-11-1999
			US	5474796 A	12-12-1995
			US	6589726 B1	08-07-2003
			US	2005009092 A1	13-01-2005
			AT	156034 T	15-08-1997
			CA	2163781 A1	08-12-1994
			DE	69404657 D1	04-09-1997
			DE	69404657 T2	18-12-1997
			EP	0703825 A1	03-04-1996
			JP	9500568 T	21-01-1997
			WO	9427719 A1	08-12-1994
US 6143496	A	07-11-2000	AU	7128998 A	11-11-1998
			WO	9847003 A1	22-10-1998
			US	2002164820 A1	07-11-2002
			US	6391559 B1	21-05-2002
			US	2004171055 A1	02-09-2004
WO 0241992	A	30-05-2002	DE	10058394 C1	11-07-2002
			CA	2430217 A1	30-05-2002
			WO	0241992 A2	30-05-2002
			EP	1339495 A2	03-09-2003
			JP	2004514152 T	13-05-2004
			US	2004029203 A1	12-02-2004
WO 0187458	A	22-11-2001	AU	6146201 A	26-11-2001
			AU	6146301 A	26-11-2001
			WO	0188525 A1	22-11-2001
			WO	0187458 A1	22-11-2001
			US	2002023841 A1	28-02-2002

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/050526

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 B01L3/00 B01J19/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 B01L B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 03/059518 A (ALDERMAN JOHN CHARLES ; O'CONNOR ROSEMARY (IE); PAPKOVSKY DMITRI (IE);) 24 juillet 2003 (2003-07-24) le document en entier -----	1-42
X	US 6 565 813 B1 (GARYANTES TINA) 20 mai 2003 (2003-05-20) colonne 3, ligne 13 - colonne 7, ligne 37 -----	1-42
X	US 6 210 894 B1 (BRENNAN THOMAS M) 3 avril 2001 (2001-04-03) colonne 3, ligne 66 - colonne 9, ligne 29 -----	1-42
A	US 6 143 496 A (KALININA OLGA V ET AL) 7 novembre 2000 (2000-11-07) le document en entier ----- -/-	1-42



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 février 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/03/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Skowronski, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/050526

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 02/41992 A (MUND KONRAD ; HINTSCHE RAINER (DE); SIEMENS AG (DE); STANZEL MANFRED () 30 mai 2002 (2002-05-30) le document en entier -----	1-42
A	WO 01/87458 A (AHN CHONG H ; CHO HYOUNG J (US); CHOI JIN WOO (US); UNIV CINCINNATI (U) 22 novembre 2001 (2001-11-22) le document en entier -----	1-42

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/050526

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 03059518	A	24-07-2003	AU 2003202120 A1 EP 1465730 A2 WO 03059518 A1	30-07-2003 13-10-2004 24-07-2003
US 6565813	B1	20-05-2003	US 2004018615 A1 CA 2318881 A1 EP 1060022 A1 JP 2002502955 T WO 9939829 A1	29-01-2004 12-08-1999 20-12-2000 29-01-2002 12-08-1999
US 6210894	B1	03-04-2001	US 5985551 A US 5474796 A US 6589726 B1 US 2005009092 A1 AT 156034 T CA 2163781 A1 DE 69404657 D1 DE 69404657 T2 EP 0703825 A1 JP 9500568 T WO 9427719 A1	16-11-1999 12-12-1995 08-07-2003 13-01-2005 15-08-1997 08-12-1994 04-09-1997 18-12-1997 03-04-1996 21-01-1997 08-12-1994
US 6143496	A	07-11-2000	AU 7128998 A WO 9847003 A1 US 2002164820 A1 US 6391559 B1 US 2004171055 A1	11-11-1998 22-10-1998 07-11-2002 21-05-2002 02-09-2004
WO 0241992	A	30-05-2002	DE 10058394 C1 CA 2430217 A1 WO 0241992 A2 EP 1339495 A2 JP 2004514152 T US 2004029203 A1	11-07-2002 30-05-2002 30-05-2002 03-09-2003 13-05-2004 12-02-2004
WO 0187458	A	22-11-2001	AU 6146201 A AU 6146301 A WO 0188525 A1 WO 0187458 A1 US 2002023841 A1	26-11-2001 26-11-2001 22-11-2001 22-11-2001 28-02-2002

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)